





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID**

**Facultad de Farmacia**

**Departamento de Microbiología y  
Parasitología**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la transmisión y la epidemiología de  
*Clostridioides difficile* mediante la secuenciación de  
genoma completo**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**SERGIO GARCÍA FERNÁNDEZ**

**DIRECTORAS**

**Dra. María Isabel Morosini Reilly**

**Dra. Rosa del Campo Moreno**

**Madrid, 2019**



*A mis abuelos*



## **Agradecimientos**

En primer lugar a mis maravillosas directoras de Tesis, la Dra. María Isabel Morosini y la Dra. Rosa del Campo. He tenido la gran suerte de crecer como microbiólogo y como investigador junto a vosotras. Gracias por vuestra dedicación y ayuda, sin vuestro apoyo incondicional esta tesis no hubiera sido posible. Os agradezco muy especialmente todo el cariño y amistad. Gracias por confiar en mí.

Al Dr. Rafael Cantón. Por las oportunidades que me has brindado y por ser un ejemplo de trabajo y constancia. Gracias por la orientación y el soporte que me han hecho desarrollarme personal y profesionalmente.

A todas las personas que con su ejemplo y dedicación me han enseñado a querer y ejercer la Microbiología. Muy especialmente a todos los residentes con los que he compartido tantos momentos; y a cada uno de los adjuntos, técnicos y compañeros de investigación con los que he coincidido durante estos años en el Servicio de Microbiología del Ramón y Cajal. Os llevo a todos conmigo.

A Zaira. Por ser modelo de esfuerzo para lograr lo que te propones y por ser una gran compañera de viaje cada día.

A mi familia. Por darme la libertad de escoger mi camino y las herramientas para lograrlo.





## ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	5
RESUMEN .....	7
SUMMARY .....	9
INTRODUCCIÓN .....	11
1- <i>Clostridioides difficile</i> .....	13
1.1-HISTORIA Y DESCUBRIMIENTO.....	13
1.2-PATOGÉNESIS Y FACTORES DE VIRULENCIA .....	14
1.2.1-Locus de patogenicidad.....	15
1.2.2-Toxinas A y B.....	16
1.2.3-Toxina binaria .....	18
1.2.4-Esporas .....	19
1.3-COLONIZACIÓN Y PORTADORES ASINTOMÁTICOS .....	20
1.4-TRANSMISIÓN DE <i>C. difficile</i> .....	23
1.4.1- Factores que intervienen en la transmisión .....	23
1.4.1.1-Factores dependientes del ribotipo .....	23
1.4.1.2-Exposición a las esporas.....	24
1.4.1.3-Factores dependientes del huésped .....	24
1.4.2-Reservorios de <i>C. difficile</i> .....	25
1.4.2.1-El hospital como reservorio .....	25
1.4.2.2-La comunidad y el medio ambiente como reservorio .....	27
1.5- MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN DE <i>C. difficile</i> .....	29
2-INFECCIÓN POR <i>Clostridioides difficile</i> (ICD) .....	35
2.1-MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ICD .....	35
2.1.1-Manifestaciones clínicas y clasificación de la ICD .....	35
2.1.2-Factores de riesgo de la ICD.....	36
2.1.3-Reurrencias de la ICD .....	37
2.2-DIAGNÓSTICO DE LA ICD .....	38
2.2.1-Diagnóstico clínico.....	39
2.2.2-Diagnóstico microbiológico.....	39
2.3-TRATAMIENTO DE LA ICD.....	43
2.3.1-Recomendaciones: Guías Europea y Americana.....	43
2.3.2-Trasferencia de microbiota fecal (TMF) .....	45

2.3.3-Nuevos tratamientos.....	47
2.4-EPIDEMIOLOGÍA E INCIDENCIA DE ICD.....	48
2.4.1-Epidemiología e incidencia en Europa .....	49
2.4.2-Epidemiología e incidencia en América .....	49
2.4.3-Epidemiología e incidencia en Asia, Australia y África.....	51
2.4.4-Epidemiología e incidencia en España .....	52
2.5-PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ICD .....	53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
1 - Diseño y población de estudio .....	61
2 - Definición de caso, nuevo caso y recurrencia .....	61
3 - Diagnóstico de ICD .....	61
4 – Origen del caso de ICD .....	62
4 – Incidencia, estancia hospitalaria y tiempo hasta el diagnóstico .....	63
6 – Análisis molecular de los aislados clínicos de <i>C. difficile</i> .....	64
7 – Secuenciación de genoma completo (SGC) .....	67
8 – Estudio molecular de un brote de ICD causado por el ribotipo 018.....	69
9 – Transferencia de microbiota fecal (TMF) .....	69
RESULTADOS .....	71
CAPÍTULO 1: Epidemiología de la ICD (2013-2018).....	75
CAPÍTULO 2: Utilidad de la secuenciación de genoma completo para el estudio de la diversidad genética y de las rutas de transmisión de <i>C. difficile</i> .....	89
CAPÍTULO 3: Transferencia de microbiota fecal para el tratamiento de la ICD recurrente .....	113
DISCUSIÓN.....	117
CONCLUSIONES .....	135
BIBLIOGRAFÍA .....	139
ANEXOS .....	163

## LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNr: ADN ribosomal  
ARN: Ácido ribonucleico  
BHI: Medio líquido cerebro-corazón  
CA: Adquisición en la comunidad  
CDT: Toxina binaria  
CMI: Concentración mínima inhibitoria  
CPM: Colitis pseudomembranosa  
CO-HCFA: Adquisición hospitalaria de inicio en la comunidad  
CT: Cultivo toxigénico  
DE: Desviación estándar  
ECT: Ensayo de citotoxicidad  
EIA: Enzimoimmunoanálisis  
ESCMID: *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*  
ESGCD: *ESMID Study Group for Clostridioides difficile*  
EUCAST: *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*  
FDA: *Food and Drug Administration*  
GDH: Glutamato deshidrogenasa  
HA: Adquisición hospitalaria (HO y CO-HCFA)  
HO: Adquisición hospitalaria de inicio hospitalario  
IBP: Inhibidores de la bomba de protones  
ICD: Infección por *Clostridioides difficile*  
ICDr: Infección por *Clostridioides difficile* recurrente  
IDSA: *Infectious Diseases Society of America*  
IQR: Rango intercuartílico  
MLST: Tipificación de secuencias de múltiples *loci*  
MLVA: Variabilidad del número de repeticiones en tándem en múltiples *loci*  
PCR-CE: Ribotipificación por PCR y posterior electroforesis capilar  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PFGE: Electroforesis en campo pulsado

REA: Análisis por endonucleasas de restricción  
SGC: Secuenciación de genoma completo  
SNP: Polimorfismos de nucleótido único  
ST: Secuencia tipo (MLST)  
STRD: *Summed tandem repeat difference*  
TAAN: Técnica de amplificación de ácidos nucleicos  
TBE: Tampón tris borato-EDTA  
TMF: Transferencia de microbiota fecal  
UCI: Unidades de Cuidados Intensivos  
VPN: Valor predictivo negativo

## ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Disbiosis.
- **Figura 2.** Locus de patogenicidad.
- **Figura 3.** Toxinas TcdA y TcdB.
- **Figura 4.** Modelo de adquisición de *C. difficile*.
- **Figura 5.** Tasas de colonización en diferentes grupos.
- **Figura 6.** Persistencia de cultivos positivos tras tratamiento.
- **Figura 7.** Transmisión humanos-animales de *C. difficile*.
- **Figura 8.** Factores de riesgo asociados significativamente con el mayor riesgo de ICD.
- **Figura 9.** Algoritmo diagnóstico de 2-3 pasos.
- **Figura 10.** Ensayos clínicos registrados mediante TMF para distintas patologías.
- **Figura 11.** Eventos de transmisión inferidos del ribotipo epidémico 027.
- **Figura 12.** Línea de tiempo que representa la clasificación del origen de la ICD.
- **Figura 13.** Casos anuales de ICD según método diagnóstico.
- **Figura 14.** Distribución de los casos totales de ICD por grupos de edad.
- **Figura 15.** Distribución de los casos según lugar de adquisición.
- **Figura 16.** Distribución por servicios médicos de los casos de adquisición hospitalaria.
- **Figura 17.** Distribución global de los ribotipos.
- **Figura 18.** Distribución de los principales ribotipos por año de estudio.
- **Figura 19.** Distribución de los ribotipos mayoritarios en el ambiente hospitalario y comunitario.
- **Figura 20.** Distribución porcentual de los ribotipos mayoritarios clasificados por grupos de edad.
- **Figura 21.** Diagrama de estudio empleado en el análisis de las rutas y frecuencias de transmisión de *C. difficile*.
- **Figura 22.** Árbol de máxima verosimilitud en el que se muestran todas las cepas secuenciadas.
- **Figura 23.** Árbol filogenético de los aislados pertenecientes al ribotipo 001.
- **Figura 24.** Árbol filogenético de los aislados pertenecientes al ribotipo 027.
- **Figura 25.** Árbol filogenético de los aislados pertenecientes al ribotipo 078.
- **Figura 26.** Árbol filogenético de los aislados pertenecientes al ribotipo 106.

- **Figura 27.** Árbol filogenético de los aislados pertenecientes al ribotipo 014/020.
- **Figura 28.** Árbol filogenético de los aislados pertenecientes al ribotipo 446.
- **Figura 29.** Intervalo de tiempo transcurrido entre los aislados implicados en los probables eventos de transmisión.
- **Figura 30.** Intervalo de tiempo transcurrido entre los aislados implicados en los probables eventos de transmisión estratificado según coincidencia en servicio médico y/o tiempo.
- **Figura 31.** Probables eventos de transmisión entre los aislados pertenecientes al ribotipo 001.
- **Figura 32.** Probables eventos de transmisión entre los aislados pertenecientes al ribotipo 027.
- **Figura 33.** Probables eventos de transmisión entre los aislados pertenecientes al ribotipo 078.
- **Figura 34.** Probables eventos de transmisión entre los aislados pertenecientes al ribotipo 106.
- **Figura 35.** Probables eventos de transmisión entre los aislados pertenecientes al ribotipo 014/020.
- **Figura 36.** Probables eventos de transmisión entre los aislados pertenecientes al ribotipo 446.
- **Figura 37.** Líneas de tiempo que muestran a pacientes con 2 o más cepas de *C. difficile* secuenciadas.
- **Figura 38.** Casos de ICD en el Servicio de Gastroenterología durante 2013.
- **Figura 39.** Estancia hospitalaria de los casos confirmados de ribotipo 018.
- **Figura 40.** Relación genómica entre los casos de ribotipo 018.
- **Figura 41.** Cronología del caso de erradicación *Klebsiella oxytoca* productora de metalo-carbapenemasa VIM-1.

## ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Características de los principales métodos de tipificación de *C. difficile*.
- **Tabla 2.** Signos y síntomas clínicos compatibles con la ICD.
- **Tabla 3.** Listado de cebadores y condiciones empleadas en el análisis molecular de los aislados de *C. difficile*.
- **Tabla 4.** Datos del diagnóstico de laboratorio de ICD.
- **Tabla 5.** Incidencia de ICD en el Hospital Ramón y Cajal.
- **Tabla 6.** Distribución de los aislados caracterizados molecularmente por año de estudio respecto al total de casos anuales.
- **Tabla 7.** Diversidad de ribotipos.
- **Tabla 8.** Recidivas de ICD.
- **Tabla 9.** Reinfecciones de ICD.
- **Tabla 10.** Proporción de aislados relacionados con un caso previo ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días) entre los ribotipos mayoritarios.
- **Tabla 11.** Casos comunitarios relacionados con un caso previo ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días).
- **Tabla 12.** Probables clústeres de transmisión detectados mediante SGC.
- **Tabla 13.** Pacientes con cepas de *C. difficile* genéticamente relacionadas ( $\leq 2$  SNPs) que estuvieron en la misma cama durante sus respectivos ingresos.





## RESUMEN

*Clostridioides difficile* es un bacilo grampositivo, anaerobio productor de esporas y uno de los patógenos nosocomiales más importantes. La infección causada por *C. difficile* (ICD) es la principal causa de diarrea asociada al consumo de antibióticos en todo el mundo, y su epidemiología ha cambiado tras la irrupción de los ribotipos hipervirulentos e hiperepidémicos 027 y 078 a principios de los años 2000. Estas cepas causan infecciones más graves, con mayor mortalidad, presentan mayor capacidad de transmisión y se han diseminado por todo el mundo. El conocimiento de la epidemiología de este microorganismo en nuestro entorno es limitado y es por ello que se planteó la realización de esta Tesis Doctoral, con el objetivo principal de estudiar la epidemiología de la ICD en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, mediante la puesta a punto de las técnicas de ribotipificación por PCR y la posterior electroforesis capilar así como la secuenciación de genomas completos (SGC).

En el **primer capítulo** se describe la incidencia y las características clínicas de los pacientes diagnosticados de ICD entre los años 2013 y 2018, identificándose una tendencia creciente de casos diagnosticados y de peticiones para el diagnóstico microbiológico durante el período de estudio. El mayor conocimiento de la enfermedad por parte de los médicos peticionarios, junto con el empleo de técnicas más sensibles en el Servicio de Microbiología, explica en parte el aumento de los diagnósticos. Además, se corroboró que la ICD ha dejado de ser una patología casi exclusivamente asociada al entorno hospitalario para tener una presencia creciente en la comunidad (del 21,4% al 30,6%). En este capítulo se analizan también los resultados epidemiológicos obtenidos tras implementar la técnica de caracterización molecular de referencia, la ribotipificación con electroforesis capilar, identificándose gran diversidad de cepas circulantes (124 ribotipos diferentes), aunque únicamente 5 ribotipos (078, 106, 014/020, 001 y 027) fueron los responsables del 64,7% de los episodios de ICD.

En el **segundo capítulo** se analiza mediante SGC las rutas y frecuencias de transmisión de los principales ribotipos. Se detectó una mayor frecuencia de transmisión en los ribotipos asociados al ambiente hospitalario [027 (60,0%), 106 (23,8%) y 001 (33,3%)], respecto a los ribotipos más asociados a la comunidad y al mundo animal [078 (11,9%) y 014/020 (2,8%)]. Entre los eventos de transmisión identificados, tan solo el 17% se produjeron entre pacientes que habían coincidido al mismo tiempo en el mismo Servicio Médico, ocurriendo el 44% de las transmisiones entre pacientes que no

coincidieron en tiempo y el 39% entre pacientes que habían coincidido temporalmente, pero en distintas áreas. Nuestros resultados identificaron 17 clústeres de transmisión en tres años afectando a 85 pacientes en total, lo que nos lleva a hipotetizar que la transmisión ocurrió sin contacto directo entre pacientes sintomáticos. El ribotipo hipervirulento 027 se detectó por primera vez en nuestro hospital en septiembre de 2014, y hasta 2018 afectó a 32 pacientes, causando una situación de endemicidad debido a su alta transmisión. La SGC permitió trazar un brote de ICD que afectó al menos a 12 pacientes causado por el ribotipo 018 en el año 2013, un linaje que no se encuentra entre los prevalentes en nuestro entorno. Nuestros resultados confirmaron que la SGC es una herramienta fundamental en los estudios de Epidemiología Molecular para el control y emergencia de clones. Además, esta técnica ha permitido cambiar importantes paradigmas sobre esta enfermedad, como es el modo de transmisión en el que intervienen múltiples factores. Finalmente, hay que destacar que los esfuerzos para el control de la ICD y de su transmisión no se deberían circunscribir al control de los pacientes sintomáticos, ya que los asintomáticos podrían ser también parte de la cadena de transmisión.

En el **tercer capítulo** se describe la puesta a punto de la técnica de Transferencia de Microbiota Fecal (TMF) para el tratamiento de la ICD recurrente o refractaria. Los Servicios de Microbiología, Gastroenterología y Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal, constituyeron el primer programa de TMF en España en 2015. Durante el periodo de estudio se realizaron 29 intervenciones, con tasas de curación próximas al 90%. Se describe la erradicación de la colonización por *Klebsiella oxytoca* productora de carbapenemasa tras la realización de una TMF para el tratamiento de ICD recurrente causada por el ribotipo 027, reforzando la posible utilidad de este procedimiento para la descolonización de pacientes con microorganismos multirresistentes. También se ha comprobado el estado de colonización por *C. difficile* tras el TMF, ya que, a pesar de ser una terapia clínicamente efectiva, se deben realizar controles de seguimiento a largo plazo.

## SUMMARY

*Clostridioides difficile* is a grampositive, anaerobic, spore-forming bacillus and one of the most important nosocomial pathogens. *C. difficile* infection (CDI) is the leading cause of diarrhoea associated with antibiotic use worldwide. The epidemiology of the ICD has changed after the emergence of the hypervirulent and hyperepidemic ribotypes 027 and 078 in the early 2000s. These strains cause more severe infections, with higher mortality, higher transmissibility and worldwide dissemination. Data concerning the epidemiology of this microorganism in our environment are limited, and this is, mainly, the main reason of this Doctoral Thesis. Our principal objective was the study of the epidemiology of ICD at the Hospital Universitario Ramón y Cajal in Madrid, through the development of PCR ribotyping techniques and the subsequent capillary electrophoresis as well as the sequencing of complete genomes (SGC).

The **first chapter** describes the incidence and clinical characteristics of patients diagnosed with ICD, identifying an increasing trend of diagnosed cases and of requests for microbiological diagnosis during the study period. In addition, it was confirmed that the ICD must not be considered a process almost exclusively associated with the hospital environment but with a growing presence in the community (from 21.4% to 30.6%). In this chapter is also analysed the epidemiological results obtained after implementing the reference technique for ribotyping with capillary electrophoresis, identifying a great diversity of circulating strains (124 different ribotypes), although only 5 ribotypes (078, 106, 014/020, 001 and 027) were responsible for 64.7% of the ICD episodes.

The **second chapter** traces by SGC the routes and frequencies of transmission of the predominant ribotypes. A higher frequency of transmission was detected in ribotypes associated with the hospital environment [027 (60.0%), 106 (23.8%) and 001 (33.3%)], with respect to those ribotypes more associated with the community and the animal world [078 (11.9%) and 014/020 (2.8%)]. Among the transmission events identified, only 17% occurred among patients who had coincided in the same Medical Service and at the same time, with 44% of transmissions occurring among patients who did not coincide in time, and 39% in patients who had coincided temporarily but in different environments. Our results identified 17 independent transmission clusters during three years, affecting 85 patients in total, which leads us to hypothesize that transmission occurred without direct contact between symptomatic patients.

Hypervirulent ribotype 027 was detected for the first time in our hospital in September 2014, and until 2018, it affected 32 patients, causing a situation of endemicity due to its high transmission through the hospital. The SGC allowed tracing an outbreak of ICD that affected at least 12 patients caused by ribotype 018 in 2013, a lineage that is not among the prevalent in our environment. Our results confirm that SGC is a fundamental tool in molecular epidemiology studies for the control and emergence of clones. In addition, this technique has allowed change important paradigms of this disease, such as the mode of transmission in which multiple factors intervene. Finally, it should be noted that efforts to control the ICD and its transmission should not be limited to the control of symptomatic patients, since asymptomatic patients are also part of the transmission chain.

The **third chapter** describes the development of the Faecal Microbiota Transfer (FMT) technique for the treatment of recurrent or refractory ICD. The departments of Microbiology, Gastroenterology and Infectious Diseases of the Ramón y Cajal Hospital, constituted the first TMF program in Spain in 2015. During the study period, 29 patients underwent interventions, with cure rates close to 90%. The eradication of the colonization with a *Klebsiella oxytoca* producing a carbapenemase after a TMF for the treatment of recurrent ICD caused by ribotype 027 is also described, reinforcing the supposed usefulness of this procedure for the decolonization of patients with multidrug-resistant microorganisms. The continuous state of colonization by *C. difficile* after TMF has been confirmed, meaning that, although being an effective clinical therapy, long-term follow-up controls should be carried out.

## INTRODUCCIÓN

---



### 1-*Clostridioides difficile*

#### 1.1-HISTORIA Y DESCUBRIMIENTO

*Clostridioides difficile* es un bacilo grampositivo, anaerobio estricto, móvil y productor de esporas ovales subterminales (rara vez terminales). Los síntomas de la infección por *C. difficile* (ICD) abarcan desde una diarrea leve, hasta la colitis pseudomembranosa (CPM), que es potencialmente mortal. *C. difficile* se describió por primera vez en muestras de heces de niños sanos recién nacidos, por Hall y O'Toole en 1935 (1), aunque en un primer momento se nombró como *Bacillus difficilis*, para reflejar la dificultad de su crecimiento en el laboratorio. Posteriormente se renombró como *Clostridium difficile* (2), y actualmente se ha reclasificado taxonómicamente como *Clostridioides difficile* (3).

La implicación de *C. difficile* en procesos diarreicos no se demostró hasta la década de 1970, cuando se describió como agente causal de la diarrea asociada al consumo de antibióticos y de la colitis pseudomembranosa (4–6), descrita en 1893 en una paciente sometida a resección quirúrgica por carcinoma gástrico y que posteriormente falleció. La autopsia reveló “membranas diftéricas” en su colon, y es por eso por lo que inicialmente se denominó CPM (7). No fue hasta la década de 1950, cuando la CPM comenzó a ser una complicación frecuente tras tratamientos antibióticos (8), pero en aquel momento se asoció a *Staphylococcus aureus* por su frecuente aislamiento en las heces de estos enfermos (9). En una serie prospectiva de 200 pacientes tratados con clindamicina, el 20% desarrolló diarrea y en el 10% se evidenció CPM mediante endoscopia (4). Este hecho supuso un hallazgo importante, pues la CPM ya era reconocida como una complicación potencialmente mortal, siendo clindamicina el tratamiento de elección para las infecciones anaerobias (8). La primera evidencia de la producción de toxinas por *C. difficile* se tuvo en 1974, cuando se describió una toxina citopática en las heces de cerdos de Guinea tratados con penicilina (10). En aquel momento se atribuyó ese efecto a un virus latente, pero finalmente *C. difficile* fue reconocido como el agente causal (8). También en 1974, se demostró que la mayoría de las cepas de *C. difficile* producían toxinas pero con distintos niveles (11) y que podía encontrarse de forma habitual en el medio ambiente y en las heces de numerosos animales.

Al final del siglo XX, la incidencia de ICD aumentó progresivamente en los hospitales de los países desarrollados (12), sobre todo a partir del año 2000, con la

descripción de cepas hipervirulentas e hiperepidémicas que causan infecciones más graves con mayor mortalidad y que presentan mayor capacidad de transmisión (13, 14). El clon *C. difficile* BI/NAP1/027, descrito por primera vez en 2002 en Norte América y actualmente diseminado por todo el mundo (13, 15), agrupa a la mayoría de estas cepas hipervirulentas/hiperepidémicas.

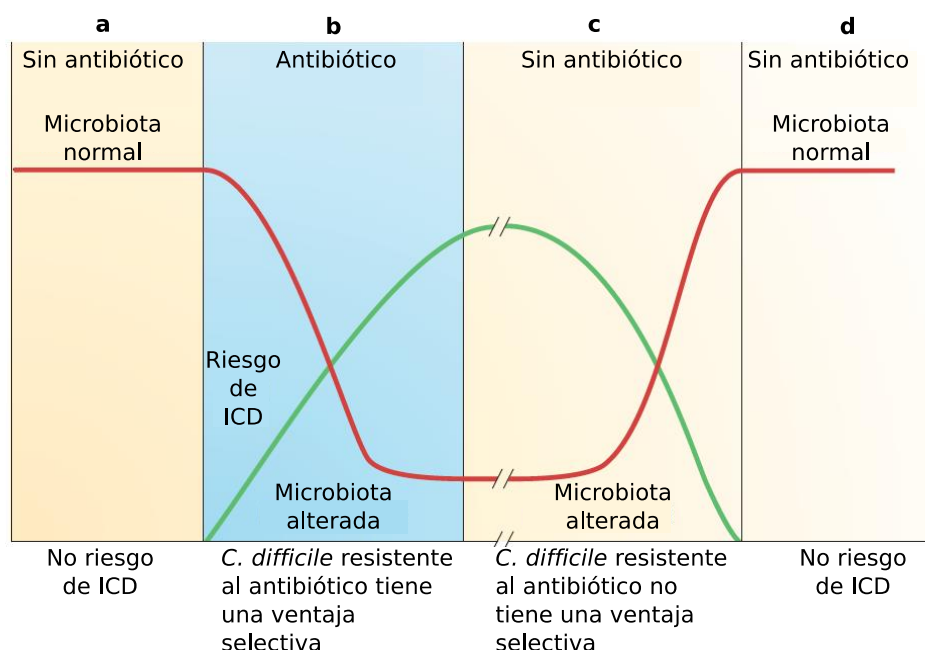
En los últimos años, el interés científico de este microorganismo ha aumentado considerablemente, no solo por el aumento de su incidencia, sino también por la introducción de nuevas terapias como la aplicación de la Transferencia de Microbiota Fecal (TMF) (16), y el empleo de Secuenciación de Genoma Completo (SGC) para estudiar su transmisión y sus aspectos evolutivos (17, 18).

### 1.2-PATOGENESIS Y FACTORES DE VIRULENCIA

La adquisición de *C. difficile* tiene lugar por vía fecal-oral a través de la ingestión de esporas que son capaces de sobrevivir al tránsito gastrointestinal y que se convierten en formas vegetativas cuando llegan al colon tras la exposición a las sales biliares que favorecen su germinación. A partir de este momento, puede ocurrir desde una colonización asintomática y transitoria, hasta un proceso de infección que curse con diarrea fulminante. El factor más importante que determina la colonización *versus* la infección es la microbiota del colon, particularmente cuando existen alteraciones importantes en su composición, fundamentalmente con pérdida de su diversidad (disbiosis). Estas alteraciones ocurren de forma habitual tras la toma de antibióticos, generalmente por procesos no relacionados con *C. difficile*, pero que favorecen primero la colonización y después la infección con la producción de toxinas (**Figura 1**).

El periodo de tiempo que transcurre desde la ingestión de las esporas, hasta el inicio de los síntomas puede ser variable, pero es característicamente muy corto. Se ha descrito que el 82% de los episodios de infección ocurren en un tiempo inferior a 4 semanas desde el contagio, aunque este periodo está influenciado por varios factores, tanto del hospedero como del microorganismo (14, 19, 20). Se ha determinado que la virulencia de *C. difficile* reside en las toxinas A y B, la toxina binaria (en el caso de estar presente), el locus de patogenicidad y la producción de esporas.





**Figura 1. Disbiosis.** a) En ausencia de antibiótico, la microbiota habitual del colon evita la ICD. b) En presencia de antibiótico, la densidad poblacional de la microbiota se reduce, algunas especies incluso desaparecen y *C. difficile* coloniza mejor. c) Cuando finaliza el tratamiento, los niveles de antibiótico en el colon descienden rápidamente, pero su impacto en la microbiota tarda en recuperarse, existiendo aún riesgo de ICD. d) Cuando se recupera la diversidad habitual del ecosistema colónico, desaparece el riesgo de ICD. Adaptada de Rupnik M *et al.* (21).

### 1.2.1-Locus de patogenicidad

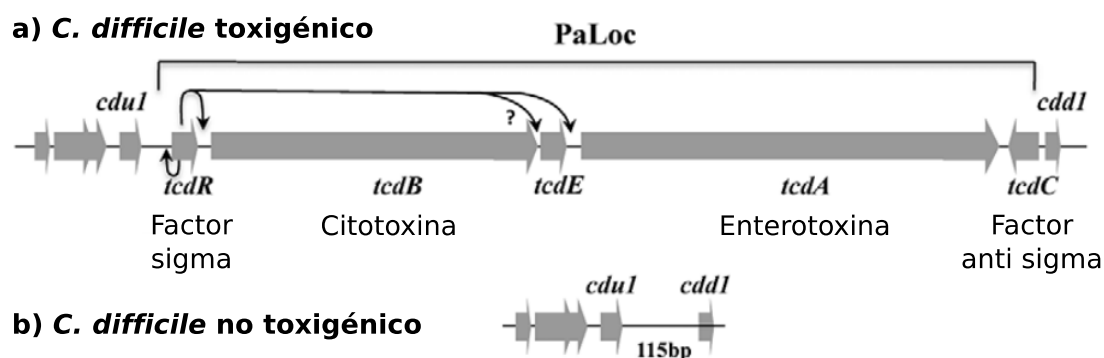
El locus de patogenicidad, también denominado PaLoc, es la región del genoma donde se encuentran los genes *tcdA* y *tcdB* que codifican las toxinas A y B, respectivamente, y que constituyen el principal factor de virulencia de *C. difficile*. Además de estos genes, PaLoc también está formado por los genes *tcdR*, *tcdE* y *tcdC* (**Figura 2**). Las cepas que no portan PaLoc en su genoma no se asocian con ICD (22), aunque también se ha descrito la transferencia horizontal de PaLoc entre aislados, pudiéndose convertir así una cepa inicialmente no toxigénica en toxigénica (23).

TcdA y TcdB son toxinas bacterianas intracelulares que glucosilan enzimas GTPasas. Forman parte de la familia de las grandes toxinas clostridiales, y ambas toxinas actúan conjuntamente para desencadenar los síntomas de la ICD. TcdA actúa como una enterotoxina, mientras que TcdB es una potente citotoxina (24, 25). Se ha comprobado que TcdB puede cumplir la función de enterotoxina en ausencia de TcdA (26).

## INTRODUCCIÓN

TcdR es una ARN polimerasa factor sigma que se encarga de activar la expresión génica de las toxinas (26, 27). TcdE es una proteína holina implicada en la liberación de las toxinas TcdA y TcdB al exterior celular (28), aunque también se ha descrito lo contrario, demostrando que la inactivación funcional del gen *tcdE* no afecta a la liberación de las toxinas (29). Por tanto, el papel de TcdE, no es aún claro.

Por otro lado, TcdC es un factor anti-sigma que aparentemente regula negativamente la síntesis de TcdA y TcdB (30), lo que se ha comprobado con la presencia de una relación inversa entre la transcripción de *tcdC* y del resto de los genes del PaLoc (31). Se han descrito variaciones en la secuencia del gen *tcdC* en las cepas hipervirulentas (ribotipos 027 y 078) que se traduce en una mayor producción de toxinas (32).



**Figura 2.** a) Representación esquemática del PaLoc en cepas toxigénicas de *C. difficile*. b) En cepas no toxigénicas, el PaLoc está sustituido por una secuencia de 115 pares de bases. Modificado de Govind R *et al.* (28).

### 1.2.2-Toxinas A y B

TcdA y TcdB presentan cuatro dominios funcionales (**Figura 3**): i) dominio enzimático amino-terminal, con actividad glucosiltransferasa, se une a una molécula de UDP-glucosa, la hidroliza y transfiere la glucosa al sustrato, ii) dominio cisteína-proteasa que participa en el procesamiento autoproteolítico de las toxinas, iii) dominio hidrofóbico, involucrado en la translocación del dominio enzimático al interior de la célula diana, iv) dominio carboxi-terminal, compuesto por repeticiones de oligopéptidos que participa en la unión al receptor que media la endocitosis (19, 33, 34).

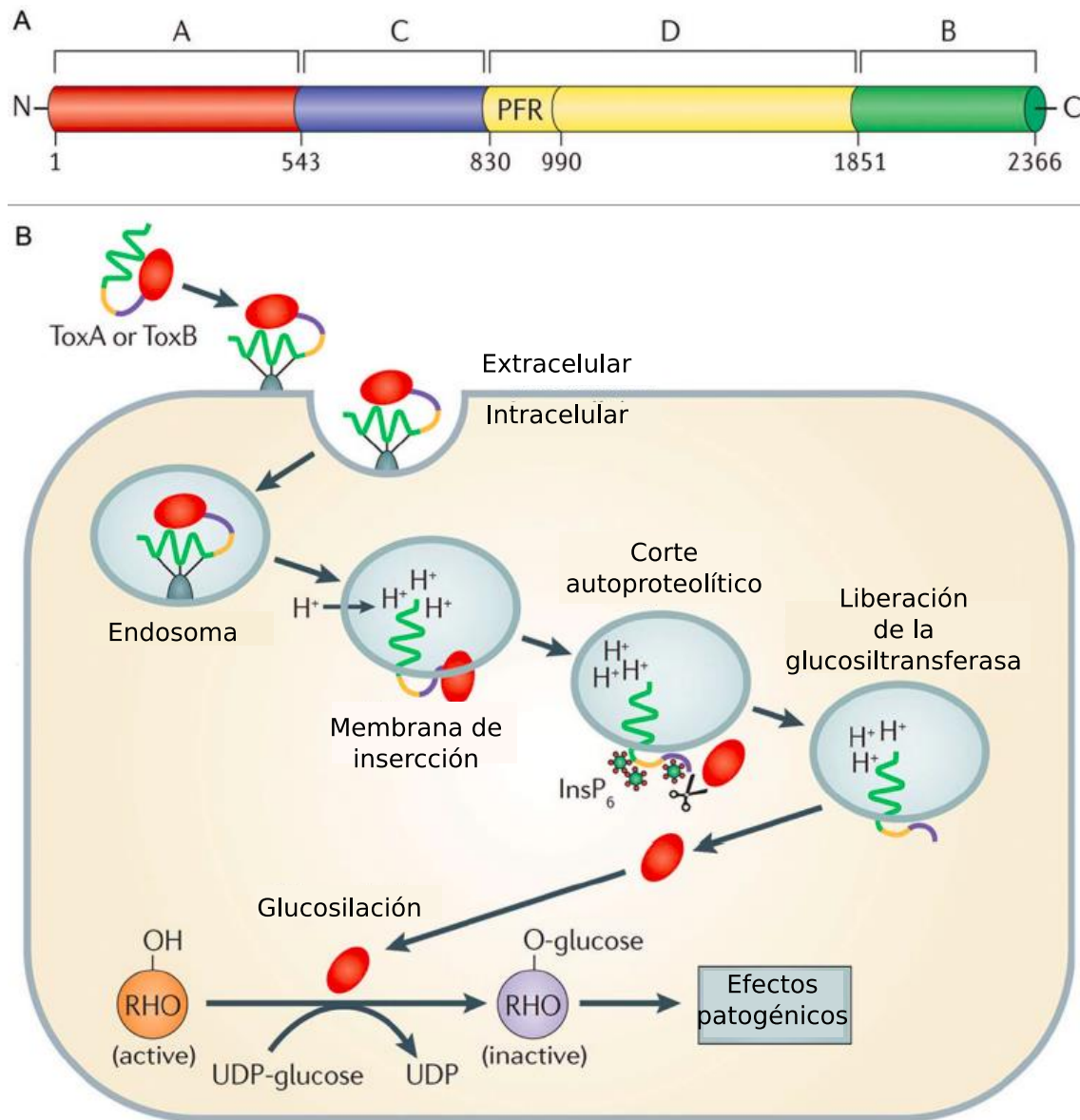
La diana de acción de las toxinas A y B son las GTPasas de las familias Rho, Ras y Cdc42, entre cuyas funciones se encuentran el mantenimiento del citoesqueleto y la

## INTRODUCCIÓN

---

adhesión celular. TcdA y TcdB glucosilan las GTPasas causando su inactividad y conduciendo a una alteración del citoesqueleto de actina (35). Las toxinas producen un efecto citopático con desestructuración de la célula, rotura de las uniones estrechas y deterioro de la función de la barrera intestinal. Finalmente, las toxinas provocan la muerte del enterocito por apoptosis o necrosis. La pérdida o elevado deterioro de la barrera intestinal conduce al acúmulo de fluidos y al daño intestinal, con liberación de citoquinas proinflamatorias, IL-1b, IL-8 y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ); todo ello atrae a los neutrófilos que acaban ocasionando aún mayor destrucción del epitelio intestinal (36, 37).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 3.** Toxinas TcdA y TcdB. a). Dominio N-terminal en rojo; dominio cisteína-proteasa en azul; dominio hidrofóbico en amarillo; y dominio C-terminal en verde. b). Proceso de invasión celular mediada por las toxinas A y B, desde la endocitosis por medio de un endosoma, hasta la glucosilación e inactivación de distintas familias de GTPasas. Modificado de Awad MM *et al.* (38).

### 1.2.3-Toxina binaria

Algunos ribotipos, entre los que se encuentran los hipervirulentos y epidémicos 027 y 078, producen una tercera toxina denominada toxina binaria (CDT) (39, 40) que está relacionada con mayor virulencia. Perteneció al grupo de las toxinas binarias

clostridiales, y está compuesta por dos subunidades: el componente enzimático ADP-ribosiltransferasa (CDTa), codificada por el gen *cdtA* y el componente de unión (CDTb), codificado por el gen *cdtB* (41). Los genes *cdtA* y *cdtB* se encuentran en el locus *cdt*, junto con el gen *cdtR*, que actúa como regulador positivo (42). CDTa, una vez dentro de la célula hospedadora, se libera en el citosol y produce la ADP-ribosilación de la G-actina, causando la despolimerización del citoesqueleto de actina, el redondeo celular y la consiguiente muerte celular. CDT además induce la formación de unas protrusiones en las células epiteliales que aumentan la adherencia y colonización de *C. difficile* (43). Actualmente existe controversia en cuanto a la relación de CDT con la virulencia, aunque en general se asume que su presencia se correlaciona con una mayor gravedad de la ICD y que potencia la toxicidad de TcdA y TcdB (44). De hecho, se ha evidenciado que los pacientes afectados por ICD productor de CDT presentan mayor mortalidad a los 30 días, incluso aun cuando estén implicados ribotipos no-027 (45, 46). Otro hecho que apoya su contribución a la ICD es la detección de CDT libre en heces de pacientes con ICD (40).

### 1.2.4-Esporas

La producción de esporas es fundamental en la patogénesis de la ICD y es un factor clave que determina la alta recurrencia de la enfermedad. Debido a su condición anaeróbica, *C. difficile* es incapaz de sobrevivir fuera de su hospedero en su forma vegetativa (47), mientras que las esporas perduran largos periodos de tiempo en el medio ambiente, incluso en condiciones adversas, y soportan el contacto con desinfectantes, antibióticos y sistema inmune (48, 49). Las esporas son causantes, en gran medida, de los procesos de infección recurrente y la transmisión entre personas, bien directamente entre individuos o a través de superficies.

El proceso por el que *C. difficile* comienza a esporular no está aún bien definido. Se postula que intervienen diferentes factores como estímulos ambientales, privación de sustratos, condiciones de estrés y señales de *quorum sensing* (50). Entre las especies de *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. es frecuente que el comienzo de la esporulación esté regulado por distintas histidín-quinasas, que fosforilan a *Spo0A*, principal regulador de la esporulación (51).

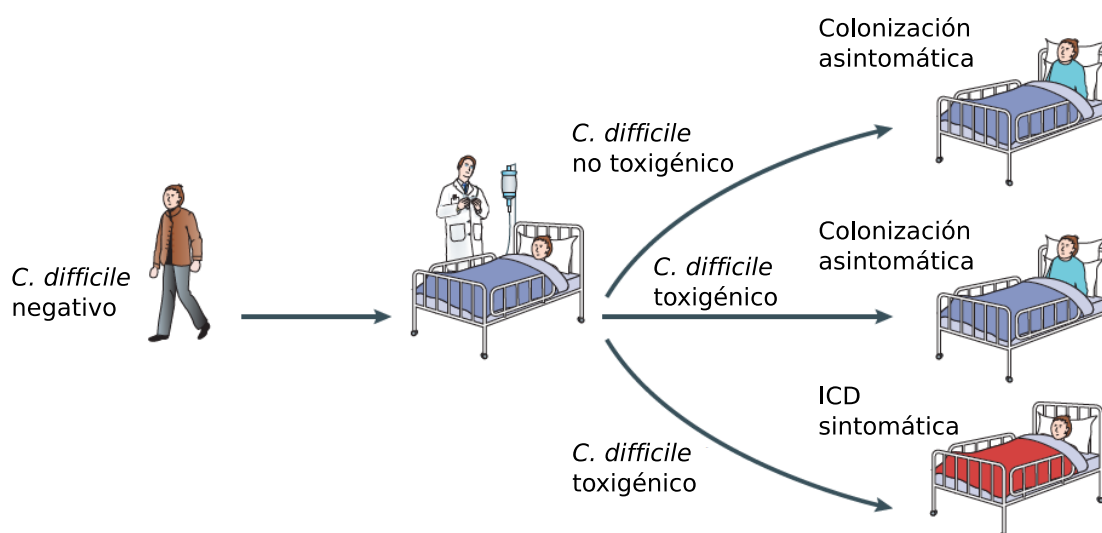
El proceso inverso, la germinación de las esporas, es un paso fundamental en la ICD y ocurre tras el contacto de la spora con sales biliares (taurocolato, glicocolato, colato y desoxicolato) y L-glicina, que actúa como co-germinante (51–53).

Curiosamente, el quenodesoxicolato, que también es una sal biliar, actúa como inhibidor de la germinación (54).

Algunos ribotipos parecen tener mayor capacidad de esporulación que otros, particularmente 027 (55, 56), pero las diferencias en esporulación parecen ser dependientes de cepa, más que de ribotipo (57).

### 1.3-COLONIZACIÓN Y PORTADORES ASINTOMÁTICOS

El estado de colonización se define como la detección del microorganismo viable en las heces en ausencia de síntomas de ICD. La colonización puede estar producida tanto por cepas toxigénicas como no toxigénicas, con diferente impacto en la transmisión de *C. difficile* y en el desarrollo de ICD, por lo que es necesario diferenciarlo en los estudios de portadores (**Figura 4**). Además, es importante tener en cuenta que la colonización es un proceso dinámico, por tanto la obtención de una única muestra positiva para *C. difficile* en una persona asintomática puede significar desde un estado de colonización persistente a uno de portador transitorio, o incluso un hallazgo casual (58). Sin embargo, esta distinción no es habitual en los estudios de portadores asintomáticos y sería una información que permitiría una mayor comprensión de los eventos de transmisión y de las medidas de control necesarias para prevenir la dispersión de *C. difficile* (59). Otra limitación importante en los estudios de portadores es la metodología empleada para el aislamiento o detección de *C. difficile*. Por norma general, es esperable que la carga bacteriana en personas colonizadas sean menores que las de los pacientes que padecen ICD. Por ello, el empleo de técnicas de detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), no puede tener la misma sensibilidad y especificidad que cuando son empleadas en el diagnóstico de ICD, por lo que su uso puede conducir a una infraestimación de las tasas de individuos colonizados. Un método basado en el cultivo de heces (con enriquecimiento), junto con la confirmación mediante cultivo toxigénico o un sistema molecular sería la opción más sensible (59).

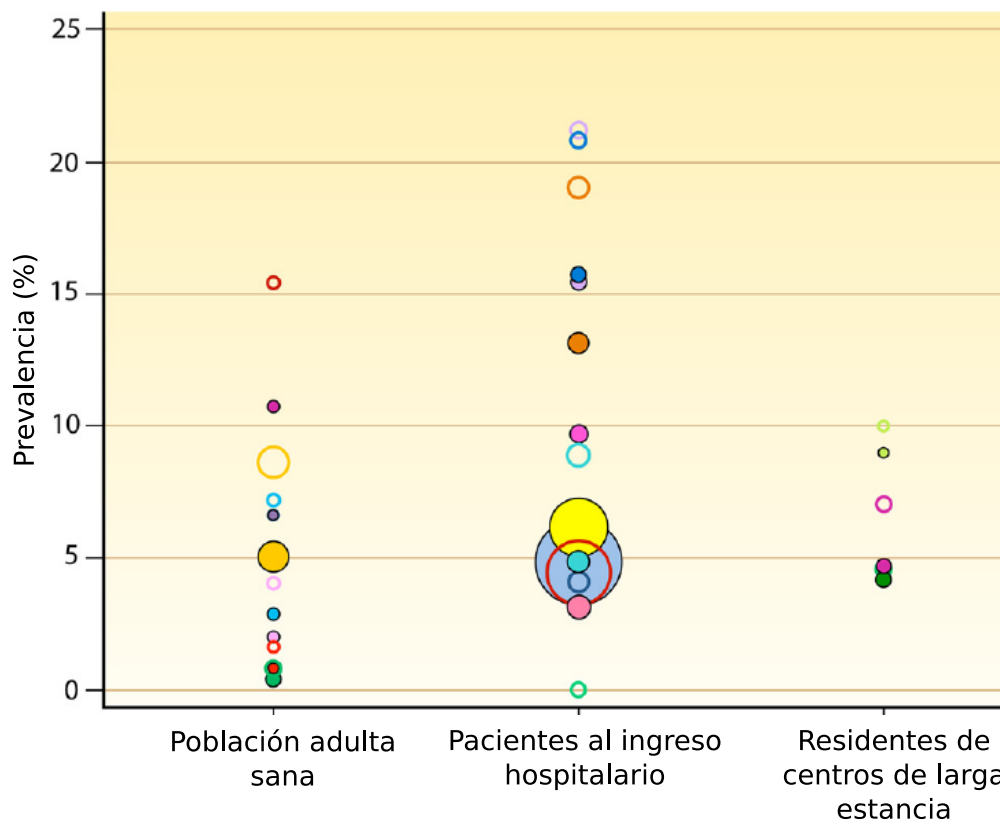


**Figura 4. Modelo de adquisición de *C. difficile*.** Los pacientes se exponen a las esporas al estar en contacto con en el medio hospitalario y el personal sanitario. Tras la toma de antibióticos, desarrollan ICD si adquieren una cepa toxigénica. Si adquieren una cepa no toxigénica, se convierten en portadores asintomáticos de *C. difficile*. Adaptada de Rupnik M *et al.* (21).

Las tasas de colonización en niños menores de 2 años son las más altas (4-71%) (59), y estos representan una importante fuente de transmisión a la población adulta. Los factores que favorecen la colonización en niños son el tipo de parto, la estancia hospitalaria y la presencia de perros en el hábitat familiar (60). A pesar de las altas tasas de colonización, el desarrollo de ICD es muy infrecuente en los niños y es por ello que las guías no recomiendan testar *C. difficile* en niños menores de 2 años (61-63). La baja incidencia de ICD durante el periodo infantil parece estar relacionada con la ausencia de receptores para las toxinas en el epitelio del colon (64). A partir de los 2 años las tasas de colonización descienden considerablemente (< 5%) (65), probablemente debido a la maduración del ecosistema microbiano intestinal tras la introducción de la alimentación sólida y variada.

En la edad adulta, las tasas de colonización difieren considerablemente entre la población sana o comunitaria y los pacientes hospitalizados. En la comunidad se recogen tasas entre el 4 y el 15% de colonización, con baja proporción de cepas toxigénicas ( $\leq 5\%$ ) (66-68) (**Figura 5**) mientras que en los pacientes hospitalizados las tasas oscilan entre el 3 y 21%, con diferente distribución geográfica (69-71). La estancia hospitalaria es el principal factor en la adquisición nosocomial de *C. difficile*,

llegándose a identificar en el 50% de los pacientes ingresados por un tiempo superior a 4 semanas (69). Se ha demostrado que la mayor parte de los pacientes son colonizados durante las 2 primeras semanas de estancia hospitalaria (72, 73).



**Figura 5. Tasas de colonización en diferentes grupos.** Prevalencia de colonización en adultos sanos, pacientes en el momento del ingreso hospitalario y residentes de centros de larga estancia. Adaptado de Crobach MJT *et al.* (59).

Se han descrito diferencias según si la colonización precede al ingreso hospitalario (detectada en el momento de la admisión al hospital) o se produce durante el mismo. Al ingreso, se ha relacionado como factor de riesgo la hospitalización previa, ICD anterior, empleo de corticosteroides u otros inmunosupresores, presencia de diarrea por otra causa y presencia de anticuerpos frente a la toxina B (70, 74). La colonización durante el ingreso está condicionada por las hospitalizaciones previas, la quimioterapia, el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP) y la presencia de anticuerpos de la toxina B (67, 75). Se han detectado diferencias en los factores de riesgo de colonización por cepas toxigénicas [hospitalizaciones previas, consumo de cefepima, diálisis crónica y polimorfismos del *Toll-Like Receptor-4* (73, 76)] respecto a las no toxigénicas [uso de



cefuroxima y glucopéptidos (73)]. En el ambiente comunitario no hay demasiados estudios sobre los factores de riesgo y lo que más se ha descrito es la asociación con el consumo previo de antibióticos (77). Curiosamente, la condición de habitar en proximidades a granjas no se ha relacionado con una mayor probabilidad de colonización por *C. difficile* (77, 78).

Se ha estudiado la relación entre ser portador y el riesgo de padecer una ICD y se ha visto que los pacientes colonizados por cepas toxigénicas tienen más riesgo de progresar hacia ICD durante su ingreso hospitalario (66, 68, 71), pero curiosamente, los pacientes colonizados por cepas no toxigénicas podrían estar incluso protegidos para el desarrollo de ICD (59).

### 1.4-TRANSMISIÓN DE *C. difficile*

Tradicionalmente se ha considerado a *C. difficile* como un patógeno hospitalario y a la ICD como una infección nosocomial. El aumento de la incidencia de esta enfermedad en los últimos años, tanto en el ámbito hospitalario como comunitario, ha supuesto un cambio en la manera de entender esta enfermedad. Además, la aplicación de la SGC en el estudio de la Epidemiología Molecular y Genómica ha demostrado que la transmisión de este patógeno es mucho más compleja que un simple intercambio paciente-paciente, y en la que intervienen múltiples factores y escenarios.

#### 1.4.1- Factores que intervienen en la transmisión

La eficacia de la transmisión de *C. difficile* está influenciada por las características intrínsecas de la cepa/ribotipo, la exposición de la persona al inóculo/esporas, y finalmente también de la susceptibilidad individual de cada persona.

##### 1.4.1.1-Factores dependientes del ribotipo

El ribotipo 027 es el clon más estudiado en la ICD ya que desde su descripción a comienzos del siglo XXI ha causado brotes por todo el mundo (79, 80). Entre los factores que han propiciado su gran dispersión destaca su resistencia a quinolonas (81), lo que favorece su persistencia en el entorno hospitalario. Otros ribotipos causantes de brotes con resistencia a quinolonas son 001, 018 y 106 (82, 83). El uso de trehalosa como estabilizante alimentario ha contribuido a la dispersión del ribotipo 027 (mutaciones en el represor que metaboliza la trehalosa) y del ribotipo 078

(adquisiciones de 4 genes del transporte de trehalosa) (18), ya que coinciden en el tiempo las fechas de aprobación de trehalosa como aditivo alimentario y el inicio de los brotes (84). Tras las modificaciones genéticas, las cepas son capaces de crecer en bajas concentraciones de trehalosa, mientras que el resto de ribotipos no pueden hacerlo. También se ha confirmado que el ribotipo hipervirulento 027 posee genes relacionados con mayor motilidad, resistencia a antibióticos, supervivencia y toxicidad (85), así como otros factores de germinación y esporulación, adherencia celular y producción de toxinas (14), y todo ello contribuye a su hiperendemicidad.

### 1.4.1.2-Exposición a las esporas

Ya se ha comentado que *C. difficile* se adquiere a través de la ruta fecal-oral por medio de esporas y que en el medio hospitalario es particularmente frecuente la existencia de estas esporas (17). La diseminación de las esporas puede ocurrir a través de las manos de los trabajadores sanitarios, el movimiento de los pacientes y las visitas de familiares. Las esporas son capaces de sobrevivir largos periodos de tiempo en superficies ambientales, debido a su resistencia a desinfectantes de uso común, al calor, a la desecación y al etanol 70%. Todo ello aumenta la probabilidad de exposición a la mismas y potencia su transmisión (86–88).

El aumento de la incidencia de *C. difficile* en el ambiente comunitario sugiere que la exposición a las esporas no se restringe al ámbito nosocomial, sino que estamos expuestos de una manera continua a través del contacto con animales y su presencia en comida, suelos y aguas (14).

### 1.4.1.3-Factores dependientes del huésped

El éxito en la colonización de *C. difficile* depende en gran medida de la composición y diversidad de la microbiota intestinal de cada persona. Los pacientes afectados por ICD presentan una menor carga bacteriana en su intestino, pero sobre todo se caracterizan por la importante reducción de la diversidad (menor número de especies) (89). El principal factor que propicia esta disbiosis es el consumo de antibióticos, siendo los más asociados con la ICD la clindamicina, las fluoroquinolonas y las cefalosporinas (81, 90). Los IBP también son causa importante de la ICD y por tanto responsables de la transmisión (91), ya que disminuyen el contenido ácido del estómago reduciendo su capacidad de matar las esporas de *C. difficile*. La edad es otro factor limitante en la

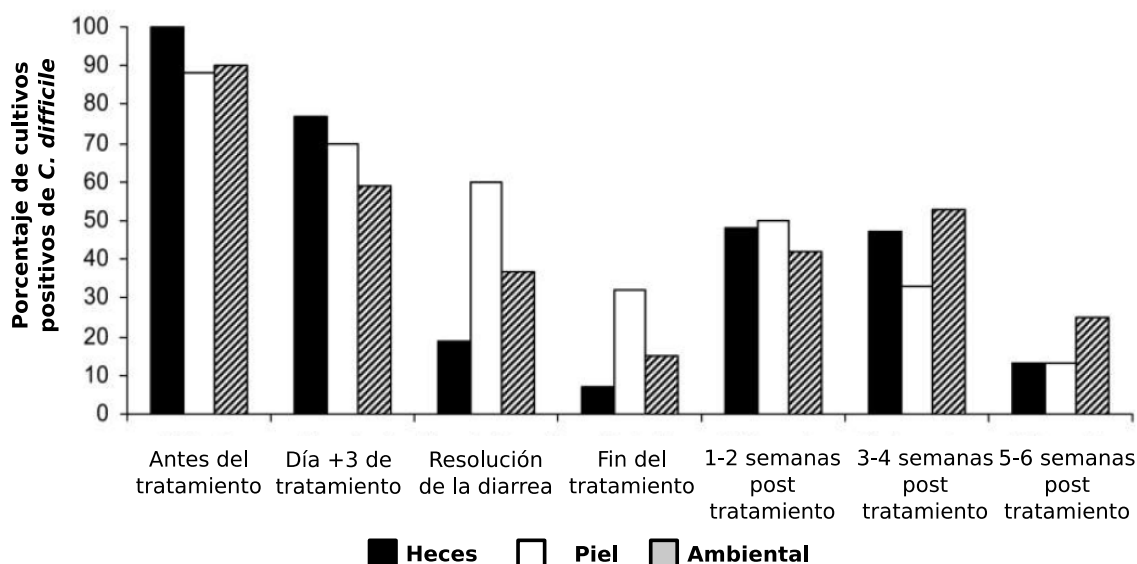
susceptibilidad del hospedero frente a la colonización, debido al deterioro gradual del sistema inmune junto con el las comorbilidades previas del paciente añoso (92).

### 1.4.2-Reservorios de *C. difficile*

El hospital es un ambiente propicio para *C. difficile*, así como una fuente de transmisión continua, ya sea por los pacientes, el personal sanitario o los fómites. El consumo de antibióticos selecciona la persistencia de los clones resistentes conocidos como de alto riesgo hospitalario (High-Risk Clones). Fuera de los hospitales, también hay transmisión de *C. difficile*, de hecho su incidencia comunitaria ha aumentado en los últimos años y se ha documentado el patógeno en animales domésticos y salvajes, en alimentos y en lugares públicos.

#### 1.4.2.1-El hospital como reservorio

La probabilidad de colonización por *C. difficile* es máxima en los hospitales (2,3% por día), seguido de los centros de cuidados de larga estancia (0,37% por día) y por último la comunidad (0,23% por día) (93). También se ha estimado que el ratio de transmisión de un paciente sintomático con ICD respecto a uno asintomático es 15 veces mayor (93), y que los pacientes con ICD dispersan esporas durante la diarrea y después de haber completado el tratamiento antibiótico hasta al menos la sexta semana post-tratamiento (**Figura 6**) (94). La mayoría de los eventos de transmisión ocurren en durante la primera semana desde el inicio de los síntomas (65%), mientras que, tras 8 semanas de infección la posibilidad de transmisión se limita al 10% (95). Así pues, la transmisión de *C. difficile* no está solamente circunscrita a la duración de la diarrea.



**Figura 6. Persistencia de cultivos positivos tras el tratamiento.** Porcentaje de cultivos positivos de heces, piel (tórax y abdomen) y ambientales (barra de cama, mesita de noche, timbre, inodoro) para *C. difficile*. Adaptado de Sethi *et al.* (94).

La transmisión de *C. difficile* desde pacientes sintomáticos ha sido objeto de numerosos estudios. El trabajo de Eyre *et al.* (17) demuestra mediante SGC que el 35% de los casos de ICD están relacionados con casos previos, aunque solamente en el 13% de los casos hay evidencias de haber compartido el mismo servicio médico. En este mismo estudio, en el 45% de los casos de ICD no se pudo identificar la fuente de la infección, lo que sugiere la existencia de rutas alternativas de transmisión a través de portadores asintomáticos, casos sintomáticos no diagnosticados, trabajadores sanitarios o de la contaminación ambiental (17). La SGC también contribuyó a conocer que el 34% de los eventos de transmisión hospitalaria ocurren por contacto directo entre los pacientes que comparten la misma cepa y el 66% por coincidir en el mismo servicio médico. Un estudio suizo analizó todos los casos de *C. difficile* asociados al ambiente hospitalario pero sin caracterización molecular de las cepas y demostró que el 56% de los pacientes infectados había tenido contacto con un caso previo de ICD (96).

Los portadores asintomáticos contribuyen sin duda a la transmisión interhospitalaria de este patógeno. En un trabajo danés se puso de manifiesto la mayor incidencia de ICD en sujetos expuestos a portadores de *C. difficile* (4,6%) respecto a los no expuestos (2,6%) (97). En un estudio en un servicio quirúrgico, se encontró que el 84% de las cepas de *C. difficile* aisladas en casos clasificados como adquisiciones nosocomiales, coincidían con cepas aisladas de portadores asintomáticos en el momento

de su ingreso (69). En otro trabajo, en el que se analizaron las cepas mediante variabilidad del número de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA), se encontró la misma proporción de casos con ICD relacionados con pacientes asintomáticos (29%) que con sintomáticos (30%) (98). Y se demostró, mediante un modelo compartimental de transmisión, que los pacientes colonizados en el momento del ingreso hospitalario contribuyen al mantenimiento de eventos de transmisión durante su estancia (99). Curiosamente, estos resultados se contradicen con los de otro trabajo en el que, mediante SGC se analizaron las cepas toxigénicas de 13 portadores asintomáticos y que no se relacionaron genéticamente con ningún otro caso de ICD durante el periodo de estudio (74). A modo de resumen podemos decir que aunque la probabilidad de transmisión parece ser significativamente menor (93), el conjunto de portadores asintomáticos es una importante fuente de transmisión ya que potencialmente puede superar al número de casos de ICD sintomática (59).

En este sentido, los trabajadores sanitarios son también vectores de transmisión de *C. difficile* en el hospital y aunque las tasas de colonización intestinal en este colectivo no son altas, incluso nulas (100, 101), hay evidencias de que la transmisión puede ocurrir a través de la dispersión de esporas en sus manos ya, que se han detectado hasta en el 24% de los trabajadores que habían atendido casos de ICD (102).

Se han detectado esporas de *C. difficile* en distintas superficies hospitalarias, incluyendo camas, suelos, baños, cómodas y mesillas de noche. También en fómites como cuñas, llamadores, toallas y material de limpieza (66, 72, 103–105). Además, se ha descrito que el riesgo a padecer ICD es mayor si el ocupante anterior de la cama ha recibido antibióticos (106) siendo también proporcional al tamaño de la habitación (104). La probabilidad de recuperar *C. difficile* en las superficies guarda relación con el estado del paciente. Mientras que en habitaciones con pacientes sintomáticos la frecuencia de contaminación puede oscilar entre el 9% y 49%, en pacientes no portadores, la frecuencia es menor al 3% (107, 108).

### **1.4.2.2-La comunidad y el medio ambiente como reservorio**

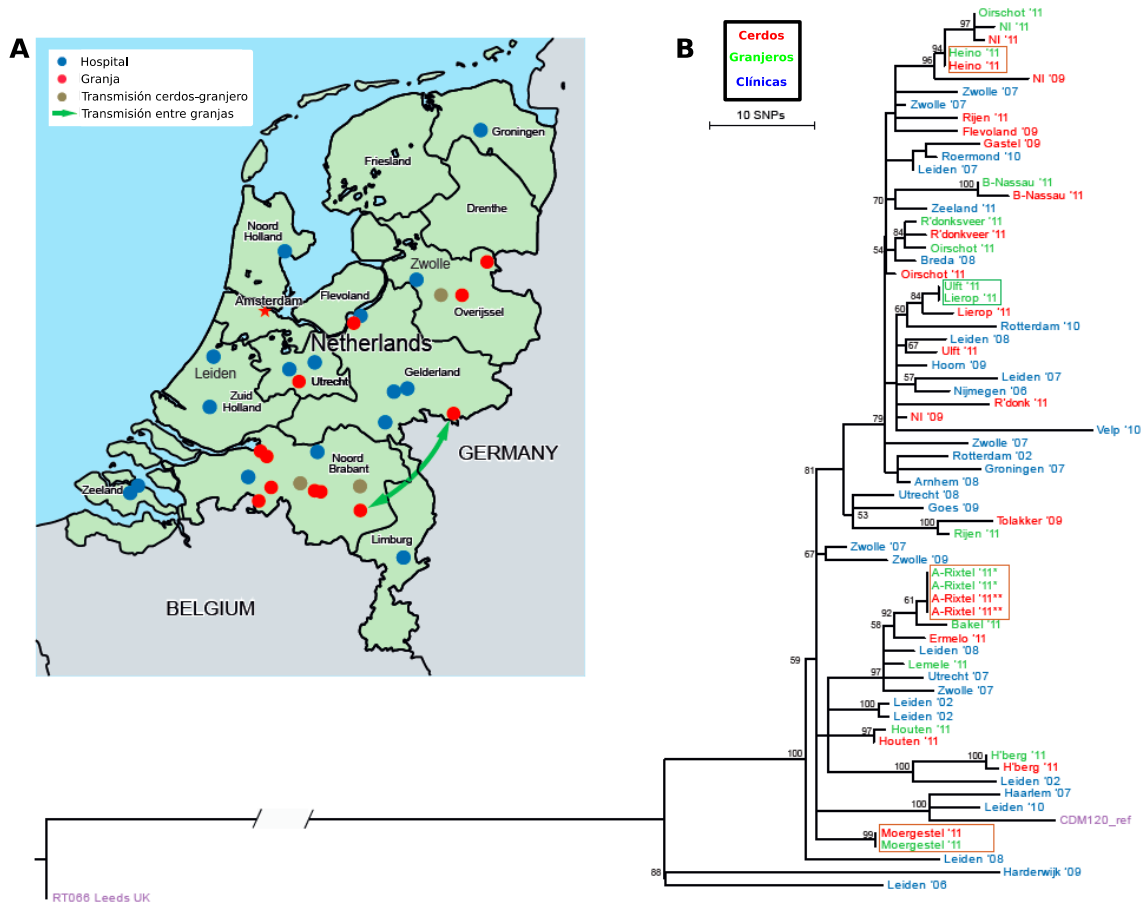
La incidencia de ICD en personas de la comunidad ha aumentado en los últimos años, afectando además a poblaciones consideradas de bajo riesgo (109). En 2012, en EE.UU., hasta el 43% de las ICD fueron de adquisición comunitaria, aumentando la incidencia 5,3 veces durante el período de estudio (110). En Francia, *C. difficile* toxigénico es el segundo patógeno bacteriano (detrás de *Campylobacter* spp.)

encontrado en muestras de heces en la población general que acude al médico (111). Estos resultados coinciden con los de Oxford donde el 45% de las ICD no se relacionaban con casos previos, existiendo por diferentes rutas de transmisión (17). También se ha demostrado en estudios epidemiológicos y mediante modelos matemáticos que la importación de casos comunitarios participa en el mantenimiento de la transmisión hospitalaria (95, 98, 112). En la comunidad, las fuentes de transmisión descritas incluyen el contacto con portadores asintomáticos o sintomáticos (93) y también con los niños, ya que se ha podido demostrar mediante SGC la presencia de cepas idénticas en pacientes hospitalizados y en niños sanos (60). Los centros de atención médica ambulatoria pueden ser también fuentes de transmisión así como las residencias de la tercera edad y centros de atención hospitalaria de corta y mediana estancia.

En las heces de ganado bovino, porcino y equino, es relativamente frecuente encontrar tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas (113-115). Distintos autores han demostrado la probable transmisión en ambos sentidos (humanos↔animales) de *C. difficile*, sobre todo en ribotipos asociados a la comunidad, como el 078 y el 014, de los que se han identificado, mediante SGC, aislados genéticamente relacionados entre humanos y animales (**Figura 7**) (116, 117), como en el caso de los cerdos y sus cuidadores (118). *C. difficile* coloniza perros, roedores, insectos e incluso animales exóticos (119-120) y se ha encontrado en la arena de parques infantiles tras contaminación de las heces de perros (121). La transmisión entre humanos y animales de compañía se ha documentado tras identificar las misma cepas de *C. difficile* en perros, gatos y sus respectivos dueños (122).

Por el contrario, la presencia de *C. difficile* en los alimentos es generalmente baja; se ha encontrado en productos destinados para el consumo, como carne picada, salchichas, chorizos, mariscos de concha, vegetales y ensaladas preparadas (123-125) aunque por el momento, no existe ningún caso de ICD de origen alimentario confirmado.

También se ha recuperado *C. difficile* de muestras de aguas, suelos, de sedimentos de ríos próximos a plantas de tratamiento de aguas residuales y de zonas de recreo público (121, 126–128), probablemente tras contaminación fecal.



**Figura 7. Transmisión entre humanos y animales de *C. difficile*.** Análisis mediante SGC que demuestra la transmisión de *C. difficile* ribotipo 078 entre humanos y animales. a) Distribución en hospitales (puntos azules) y granjas (puntos rojos) de Holanda de donde se obtuvieron las cepas del trabajo. Los puntos marrones indican granjas donde cerdos y humanos tuvieron cepas idénticas. La flecha verde indica una posible transmisión entre granjas. b) Árbol filogenético que revela la posible transmisión entre cerdos y humanos. Adaptado de Knetsch *et al.* (118)

## 1.5- MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN DE *C. difficile*

Los estudios de Epidemiología Molecular en Microbiología Clínica son necesarios por diversos motivos, entre ellos, conocer las cepas circulantes en un área concreta o en un hospital, controlar la emergencia de clones de alto riesgo o la existencia de brotes hospitalarios, y finalmente, tiene interés también en el área del diagnóstico microbiológico, pues la emergencia de cepas con mutaciones en las dianas de detección podría conducir a la infradiagnóstico del patógeno.

La tipificación de *C. difficile* se pueden basar por un lado en el análisis de bandas:

i) ribotipificación por PCR o ribotipificación por PCR y posterior electroforesis capilar (PCR-CE), ii) análisis por endonucleasas de restricción (REA), iii) variabilidad del número de repeticiones en tándem en múltiples locus (MLVA), y iv) electroforesis en campo pulsado (PFGE); o bien en el análisis de secuencias, entre los que se encuentran a) la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST) y b) la secuenciación de genoma completo (SGC) (129, 130).

Tradicionalmente, en Europa y Australia se ha empleado la ribotipificación mediante PCR, mientras que en Norteamérica se ha preferido la tipificación con PFGE o bien mediante REA (131). La coexistencia de diferentes métodos de tipificación ha propiciado diferentes nomenclaturas, lo que ha dificultado la comparación de resultados entre laboratorios o zonas geográficas. Como ejemplo de la diversidad en la nomenclatura se encuentra la cepa hipervirulenta NAP1/027/BI (PFGE, ribotipificación y toxinotipo, respectivamente). Actualmente, el método considerado como referencia es la PCR-CE (132).

Un método de tipificación ideal sería aquel que tuviese una capacidad de discriminación elevada, buena reproducibilidad y cuyos resultados fuesen comparables entre todos laboratorios. En la **tabla 1** se exponen las características de los principales métodos de tipificación de *C. difficile*.

- **Ribotipificación por PCR**

Se basa en la variabilidad que se encuentra en el espacio intergénico entre el ADN ribosomal (ADNr) 16S y el 23S, y en las múltiples copias de ADNr que hay en el genoma. Estas diferencias resultan en diferentes amplicones, específicos de ribotipo, que son separados mediante electroforesis en un gel de agarosa convencional (133). Se han descrito distintos cebadores para llevar a cabo la ribotipificación por PCR, los más habituales son los descritos por Bidet *et al.* (134) y Stubbs *et al.* (135). El análisis de las bandas se puede realizar a simple vista o mediante la construcción de un dendrograma. Es un método sencillo que tiene una reproducibilidad aceptable dentro de un mismo laboratorio, pero que sin embargo no es adecuado para realizar comparaciones entre distintos laboratorios (130).

- **Ribotipificación por PCR y posterior electroforesis capilar**

El fundamento de la técnica es el mismo que el de la ribotipificación por PCR. La diferencia radica en el empleo de un analizador genético mediante electroforesis capilar



que interpreta la diferencia de las bandas, lo que aporta mayor reproducibilidad y una interpretación más objetiva. Emplea los mismos cebadores que la ribotipificación tradicional, con la diferencia de que uno de los cebadores está marcado con un fluoróforo en uno de sus extremos (132). Habitualmente se emplean la 6-carboxifluoresceína (6-FAM) o la 5-tetraclorofluoresceína (TET). Actualmente existe una página web, [WEBRIBO (<https://webribo.ages.at/>)] que incorpora una base de datos con un repositorio de ribotipos que permite identificarlos en base a los patrones de bandas obtenidos en la electroforesis capilar (136).

- **Análisis mediante el uso de endonucleasas de restricción (REA)**

En este método se emplea el cromosoma completo de *C. difficile*. El fundamento se basa en el empleo de una enzima de restricción de corte frecuente, *HindIII*, la cual corta el ADN bacteriano en múltiples fragmentos que posteriormente son separados en un gel de agarosa (137). El REA tiene un elevado poder de discriminación, sin embargo es una técnica difícil de interpretar por el elevado número de bandas que se obtienen, lo que hace también difícil la comparación de resultados entre distintos laboratorios.

- **Electroforesis en campo pulsado (PFGE)**

La PFGE se basa en la digestión del cromosoma completo de *C. difficile* con una enzima de restricción de corte infrecuente. La enzima más empleada es *SmaI*. Permite la separación de grandes fragmentos de ADN que no se separarían mediante una electroforesis en gel de agarosa convencional. En esta técnica, los fragmentos de ADN se separan al aplicar una electroforesis a altos voltajes y con fluctuaciones de orientación del campo eléctrico (130, 138). PFGE es muy discriminatoria pero tiene el inconveniente de ser un proceso largo, que lleva varios días hasta la obtención de los resultados y que no es fácil comparar los patrones obtenidos por distintos laboratorios.

- **Tipificación de secuencias de múltiples locus**

MLST consiste en la amplificación parcial y posterior secuenciación de 7 genes conservados de *C. difficile*. A cada gen secuenciado se le asigna un número de alelo distinto. La combinación de los 7 números de alelos (perfil alélico) se identifica con una secuencia tipo (ST) (129). Existen distintos esquemas de tipificación de MLST, siendo el más empleado el descrito por Griffiths *et al.* (139). Tiene una aceptable capacidad de discriminación, los resultados son fáciles de interpretar y se pueden comparar con los

obtenidos en otros laboratorios.

- **Variabilidad del número de repeticiones en tándem en múltiples loci**

El MLVA constituye un método de tipificación con una elevada capacidad de discriminación que se emplea para el estudio de brotes y para establecer relaciones filogenéticas entre aislados (140). Consiste en la amplificación de unas regiones cortas de ADN repetidas en tándem, que varían en número y tamaño y que están repartidas por todo el cromosoma. Los amplicones se separan mediante electroforesis capilar. Existen distintos esquemas de tipificación siendo los más empleados los que amplifican 7 loci (141, 142) o 15 loci (Manzoor, 2011). A cada locus amplificado se le asigna un número que corresponde con la suma de las repeticiones. La suma de las repeticiones en cada locus amplificado se identifica como STRD (*summed tandem repeat difference*) y constituye una medida de la relación genética entre los aislados (129). Se considera que dos aislados de *C. difficile* pertenecen al mismo complejo clonal si hay una diferencia entre ellos de  $\leq 2$  STRD, y se consideran como genéticamente relacionados si la diferencia es  $< 10$  STRD (141).

- **Secuenciación de genoma completo (SGC)**

La SGC se basa en el análisis de los polimorfismos de un nucleótido único (SNP) y es actualmente el método con mayor capacidad discriminatoria en el análisis epidemiológico (143). El mayor inconveniente que tiene es el elevado coste de los equipos y la complejidad del análisis informático necesario, aunque los costes se han ido abaratando y existen disponibles herramientas informáticas de acceso gratuito y de fácil empleo. Además la SGC tiene la ventaja de generar numerosos datos adicionales, como detectar la presencia de genes de resistencia, determinantes de virulencia o realizar estudios de análisis filogenético y evolutivos, entre otros (144). Es por ello que hoy en día, la SGC se está empleando para la tipificación de la mayoría de los microorganismos y, aunque todavía no se ha convertido en el método de referencia por su elevado precio, no cabe duda de que es la herramienta con mayor capacidad de discriminación y la que se impondrá en un futuro.

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 1.** Características de los principales métodos de tipificación de *C. difficile*.

Método	Diana	Ventajas	Inconvenientes
<b>Análisis de bandas</b>			
<b>Ribotipificación por PCR</b>	16S–23S	Buen PD	No reproducible entre laboratorios
<b>PCR-CE</b>	16S–23S	Excelente PD. Reproducible entre laboratorios.	
<b>REA</b>	Genoma completo	Buen PD	Proceso complejo y no reproducible entre laboratorios
<b>PFGE</b>	Genoma completo	Moderado PD	Proceso complejo y no reproducible entre laboratorios
<b>MLVA</b>	Repeticiones en tándem	Excelente PD	Elevado coste, proceso complejo
<b>Análisis de secuencias</b>			
<b>MLST</b>	7 genes	Buen PD. Reproducible entre laboratorios.	Elevado coste
<b>WGS</b>	Genoma completo	Excelente PD	Elevado coste, experiencia informática

PD: Poder de discriminación

Tabla modificada de (129, 130, 140)



### 2-INFECCIÓN POR *Clostridioides difficile* (ICD)

#### 2.1-MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ICD

##### 2.1.1-Manifestaciones clínicas y clasificación de la ICD

La sintomatología de la ICD puede oscilar entre un cuadro leve hasta una diarrea fulminante, incluyendo el megacolon tóxico, la perforación intestinal e incluso la muerte (145) (**Tabla 2**). Esta enfermedad se estratifica según su gravedad en: leve, moderada, grave o grave-complicada, lo que condiciona su tratamiento antibiótico y la necesidad de ingreso en UCI o de cirugía. En la estimación de la gravedad intervienen pruebas del examen físico del paciente (fiebre o inestabilidad hemodinámica, etc.), pruebas de laboratorio (leucocitosis, elevación de la creatinina sérica, hipoalbuminemia, etc.), hallazgos endoscópicos (presencia de CPM) y pruebas de imagen (distensión del intestino grueso, etc.) (146). Se define como caso grave un episodio de ICD con uno o más signos o síntomas de colitis grave, y de curso complicado cuando la enfermedad cursa con efectos sistémicos de las toxinas o shock, que ocasiona ingreso en UCI, colectomía o muerte (147). Los pacientes mayores de 65 años, ingresados en UCI o inmunodeprimidos, son el colectivo de mayor riesgo de padecer un infección grave (148, 149).

El linaje de la cepa, definido generalmente por el ribotipo, también condiciona la gravedad de la enfermedad. El ribotipo 027 se asocia con mayor gravedad, peor pronóstico y mayor tasa de recurrencias (150), pero curiosamente, algunos trabajos no han observado significación clínica diferente en función del ribotipo (151), por lo que hay controversias a este respecto. En cualquier modo, en la mayoría de los hospitales, el ribotipo no se determina hasta pasado el diagnóstico, por lo que generalmente no condiciona el tratamiento.

Un caso de ICD se considera inicialmente resuelto cuando no hay diarrea tras 48 horas de la finalización del tratamiento y finalmente resuelto si la diarrea no aparece durante las 12 semanas de seguimiento (147).

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 2.** Signos y síntomas clínicos compatibles con la ICD.

Cuadro Clínico	Definición
<b>Diarrea</b>	Heces blandas (que se adapten a la forma del recipiente) o heces de los tipos 5-7 de la escala Bristol, junto con una frecuencia de 3 deposiciones en 24 horas o menos, o una frecuencia mayor de lo normal para el paciente.
<b>Íleo</b>	Signos de alteración grave de la función intestinal, como vómitos y ausencia de heces con signos radiológicos de distensión intestinal.
<b>Megacolon tóxico</b>	Signos radiológicos de distensión del colon y signos de una respuesta inflamatoria sistémica severa.

Adaptado de Alcalá L, y Debast (130, 146)

### 2.1.2-Factores de riesgo de la ICD

Como se mencionó anteriormente, en la transmisión y posterior desarrollo de la ICD intervienen factores que tiene que ver con la cepa causante de la infección, la exposición al patógeno y la susceptibilidad del hospedero. Dentro de este último, el factor más relevante sin duda son los tratamientos antibióticos.

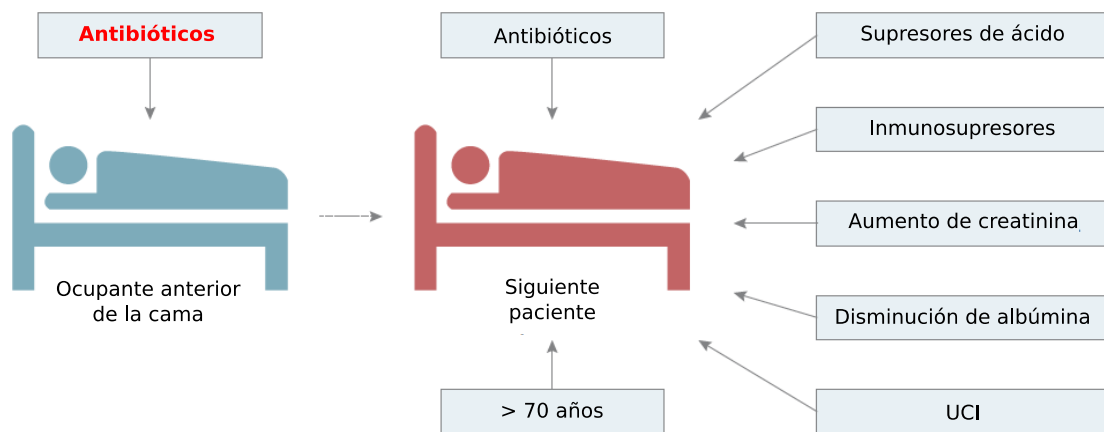
La asociación de la ICD con el consumo de los antibióticos se descubrió en la década de 1970, cuando se relacionó la CPM con el consumo de clindamicina (4). Los antibióticos que más se asocian con riesgo de ICD son los macrólidos, las cefalosporinas de segunda y tercera generación, las fluoroquinolonas y la clindamicina (152). El riesgo se mantiene incluso tras el cese de la antibioterapia hasta pasados 3 meses, siendo el riesgo más alto durante el consumo de antibióticos y el mes siguiente (153). También se ha comprobado que el riesgo de ICD es mayor a medida que se incrementa el tiempo de uso de antimicrobianos y cuanto mayor sea el número de antibióticos diferentes administrados (154).

El consumo de inhibidores de la bomba de protones (IBP) también se considera factor de riesgo para el desarrollo de ICD (155, 156), incluso sin consumo previo de antibióticos (157). A su vez, mediante meta-análisis se ha documentado que en el 65% de casos de ICD los pacientes estaban en tratamiento previo con IBP (158). Tanto en las guías europeas como en las americanas se recomienda la discontinuación de IBP en pacientes con ICD (63, 146).

## INTRODUCCIÓN

La duración de la estancia hospitalaria es un importante factor de riesgo para desarrollar ICD lo que está relacionado directamente con la mayor exposición a las esporas (94, 159). Durante la estancia hospitalaria, además, aumenta el riesgo si el compañero de habitación padece ICD (160), o si ha padecido ICD un ocupante anterior (103). Recientemente se ha descrito también como factor de riesgo, el consumo de antibióticos por parte de un ocupante anterior, aunque este último no hubiera padecido ICD (**Figura 8**) (106).

La edad avanzada también es un factor de riesgo importante por sí mismo (92), generalmente porque implica la existencia de otras comorbilidades y la senescencia del sistema inmune (161–163), por lo que la respuesta inmunitaria frente a las toxinas es menor. Finalmente, otros factores de riesgo que se han relacionado con la ICD son los procedimientos gastrointestinales no quirúrgicos, el empleo de sonda nasogástrica, la quimioterapia antineoplásica y los inmunosupresores (164, 165).



**Figura 8.** Factores de riesgo asociados significativamente con el mayor riesgo de ICD. De todos los potenciales riesgos asociados al ocupante anterior de la cama, solo el consumo de antibióticos se ha asociado con un mayor riesgo.

Adaptado de Freedberg DE *et al.* (106).

### 2.1.3-Recurrencias de la ICD

La recurrencia de la ICD (ICDr) ocurre entre el 15 y el 35% de los pacientes tras finalizar el tratamiento antibiótico del primer episodio (159, 166, 167). Además, los pacientes que tienen ya una recurrencia tienen muchas posibilidades de tener varias (168). La ICDr aumenta la mortalidad en estos pacientes, afectando también de forma

significativa a su calidad de vida aumentando los costes para los sistemas de salud (169, 170).

La ICDr ocurre por la persistencia de las esporas tras el fin del tratamiento, o bien por la reinfección con una cepa diferente del episodio inicial (171). También podría ocurrir por una re-exposición con la misma cepa, debido a que el ambiente alrededor de los pacientes puede permanecer contaminado durante largos periodos de tiempo (172). Los principales factores de riesgo de la recurrencia son similares a los que desencadenan la ICD por primera vez: la edad avanzada, el consumo previo de antibióticos y los IBP (167, 173). Además, influye el estado inmunológico del paciente y la composición de su microbiota colónica (169).

La ICDr se define como la reaparición de síntomas de ICD tras la finalización del tratamiento antibiótico, en un periodo de tiempo entre 2 y 8 semanas posteriores al episodio previo de ICD (146). Se considera como un caso nuevo independiente si hay un segundo episodio de ICD pasadas 8 semanas tras el episodio previo. Sin embargo, distinguir entre un episodio de recurrencia por recaída (ocasionada por la misma cepa del episodio de ICD previo), de una recurrencia por reinfección (ocasionada por una cepa distinta del episodio de ICD previo) no es habitualmente posible con los medios disponibles en los laboratorios de diagnóstico (159, 174). En realidad, se necesitan abordajes con mayor capacidad de discriminación para diferenciarlos, como las técnicas de SGC, MLST o MLVA. En general, todos los estudios coinciden en que la mayoría de los episodios de ICDr se deben a recaídas más que a reinfecciones (175–177) e incluso también se ha demostrado la existencia de coinfecciones (distintas cepas) en un mismo episodio de infección (178). La discriminación entre un episodio de ICDr debido a recaída o reinfección ha sido estudiado en diversos trabajos y se ha planteado la validez de la definición de recurrencia (176, 179), al menos con fines de vigilancia.

### 2.2-DIAGNÓSTICO DE LA ICD

El diagnóstico de ICD se basa en la combinación de signos y síntomas clínicos (3 o más deposiciones diarreicas en 24 horas o la detección de íleon o megacolon tóxico mediante pruebas de imagen radiológicas), con la confirmación de la presencia de una cepa productora de toxinas o de toxinas libres en las heces (63, 146, 180).



### 2.2.1-Diagnóstico clínico

Se basa fundamentalmente en la diarrea, definida como heces no formes o líquidas que se adaptan a la forma del recipiente, correspondiente con una escala Bristol entre el 5-7 y con una frecuencia de 3 o más deposiciones en un periodo de 24 horas o menos, o una frecuencia mayor de lo habitual para el paciente (63, 146). En las formas más graves como el megacolon tóxico, la ICD se puede presentar sin diarrea pero con alteración del tránsito intestinal o vómitos (61).

Para predecir la gravedad de la ICD e identificar pacientes con peor pronóstico se usan como marcadores, la fiebre, el número de deposiciones, el recuento de leucocitos y los niveles de creatinina sérica, entre otros (146, 181, 182). Aunque la evidencia aún no es suficiente, hay marcadores biológicos que pueden ayudar al diagnóstico de la ICD. Un ejemplo es la calprotectina, una proteína fijadora de calcio presente en los neutrófilos y liberada al tracto intestinal en condiciones de inflamación e infección. Otro ejemplo es la lactoferrina fecal, una proteína fijadora de hierro, presente también en los neutrófilos (183). Ambos marcadores se emplean habitualmente para distinguir causas inflamatorias de diarrea y en ambos casos se han comprobado valores aumentados en pacientes con ICD respecto a otras causas de diarrea y valores mayores en pacientes con ICD diagnosticados mediante toxina libre en heces (184, 185). Su uso también podría tener interés en la identificación de pacientes con mayor riesgo de presentar enfermedad grave o con posibilidad de recurrencia.

También se han descrito modelos de predicción para determinar la gravedad de cada caso y establecer el riesgo de recurrencia (186–188), que permiten individualizar a cada paciente y seleccionar el tratamiento para cada caso, lo que conduce a un abordaje más coste-efectivo (189).

### 2.2.2-Diagnóstico microbiológico

A la hora de aceptar una petición diagnóstica de *C. difficile*, es importante tener en cuenta las características de la muestra ya que solamente se deben procesar las heces líquidas o no formes (que se adapten a la forma del contenedor) puesto que no podemos descartar la existencia de portadores asintomáticos de *C. difficile* toxigénico. De manera excepcional, se podría aceptar una muestra en torunda (en el caso de íleo paralítico o megacolon tóxico), en este caso es preferible emplear como métodos diagnósticos una técnica de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) y el cultivo toxigénico. El

diagnóstico de laboratorio de la ICD se puede abordar con varias técnicas que a su vez emplean diferentes dianas: 1)-Detección de toxinas libres en las heces [enzimoinmunoanálisis para la detección de toxinas (EIA) o ensayo de citotoxicidad (ECT)], 2)-Presencia de *C. difficile* [EIA para la detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)] o 3)-Presencia de *C. difficile* toxigénico [(cultivo toxigénico (CT) o mediante la amplificación de ácidos nucleicos específicos] (61, 130).

- **Ensayo de citotoxicidad**

El ensayo de citotoxicidad (ECT) en un cultivo celular tiene como objetivo demostrar la presencia de la toxina B. Para su realización se emplea un filtrado de heces, el cual se inocula en una monocapa de cultivo celular. La presencia de la toxina B se pone de manifiesto con la aparición de cambios citopáticos en las líneas celulares, provocando una desestructuración celular. Las líneas celulares más comúnmente utilizadas en este tipo de ensayos son las células Vero, las HeLa, las Hep-2 y los fibroblastos humanos. El efecto citopático se observa en 24-48 horas, y el siguiente paso consiste en la neutralización del efecto citopático mediante antitoxina de *Clostridium sordelli* o de *C. difficile*, lo que aumenta la especificidad de la prueba. Este método es considerado de referencia, sin embargo, debido a que se trata de proceso prolongado (2-3 días) y complejo, su uso se limita a centros de referencia y no se emplea en los Laboratorios de Microbiología Clínicos (61, 190, 191).

- **Cultivo toxigénico**

El cultivo toxigénico es, junto al ECT, el método de referencia actual en el diagnóstico de ICD. La finalidad de esta técnica es demostrar la producción de toxina *in vitro* por parte del aislado. Hay diferentes medios para el aislamiento e identificación de *C. difficile*, entre ellos se encuentra el agar selectivo fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA), el medio cromogénico ChromID *C. difficile* (bioMérieux) y medios no selectivos como agar Brucella o agar Schaedler enriquecidos ambos con 5% de sangre de carnero, vitamina K y hemina. Todos los cultivos se incuban en condiciones anaeróbicas al menos 48 horas. Las colonias presuntivas de corresponder a *C. difficile* se identifican mediante la morfología típica, tinción de Gram, espectrometría de masas mediante MALDI-TOF, aglutinación en látex o métodos bioquímicos. En los cultivos positivos se estudia la producción de toxina mediante ECCC, un test inmunocromatográfico o un método basado en la amplificación de ácidos nucleicos por

PCR (61, 130). Debido al tiempo que conlleva la realización del CT, este no se emplea habitualmente en los Laboratorios de Microbiología como test diagnóstico, sin embargo la realización del cultivo es fundamental para llevar a cabo estudios de vigilancia epidemiológica y de sensibilidad antibiótica a partir de las colonias aisladas (192).

- **Detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)**

La GDH es una enzima metabólica presente en todas las cepas de *C. difficile*, y, por tanto, es una técnica que no debe ser usada de forma aislada para el diagnóstico ya que no diferencia entre cepas toxigénicas y no toxigénicas. Un resultado positivo de GDH requiere un test adicional que evidencie la presencia o ausencia de toxinas. Su realización de rutina se debe a su elevado valor predictivo negativo (VPN), (100% con prevalencia de ICD  $\leq$  10%), lo que prácticamente descarta la ICD si el resultado de la GDH es negativo. Debido a su elevado VPN, la GDH se usa frecuentemente como cribado de la ICD (61, 193).

- **Detección de las toxinas A/B**

Los dispositivos de EIA para la detección de toxinas detectan principalmente las toxinas A y B, sin diferenciarlas. Existen también dispositivos que integran la detección conjunta de GDH y toxinas. No deben ser empleados como método de cribado, pues su sensibilidad es baja en comparación con el CT (no supera el 86%) (61).

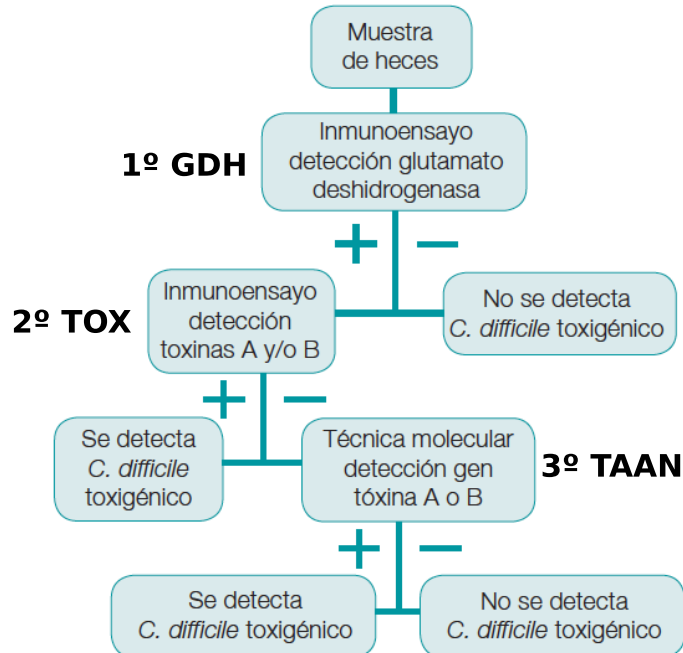
- **Técnica de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN)**

Actualmente existen numerosos sistemas basados en la amplificación selectiva de los genes que codifican las toxinas (*tcdA* y/o *tcdB*) directamente de la muestra de heces. Algunas casas comerciales incluyen además marcadores del ribotipo hipervirulento 027 (delección de 117 nucleótidos en el gen *tcdC* o los genes que codifican la toxina binaria, *cdt*). Estos sistemas tienen en general altos porcentajes de sensibilidad (73-100%) en comparación con el CT y elevado VPN (100% con prevalencia de ICD  $\leq$  10%) (61), sin embargo, no distinguen la presencia de toxina libre en heces de la presencia de los genes que codifican las toxinas. Por ello, no diferencian a un portador asintomático de un paciente con ICD, lo que podría llevar a un sobrediagnóstico de la enfermedad y consiguiente sobretratamiento (194), y por ello no se recomiendan como prueba diagnóstica única, pero sí como método de cribado. Los sistemas de TAAN tienen el

valor añadido de que el ciclo de amplificación en el que se detecta la toxina se relaciona inversamente con la carga bacteriana presente en la muestra; los ciclos de amplificación tempranos se traducen en una mayor carga bacteriana y se asocian con un peor pronóstico (195–197).

- **Algoritmos diagnósticos y recomendaciones**

Actualmente existe un consenso para el empleo de un algoritmo de 2 o 3 pasos para el diagnóstico de la ICD (61, 63). Este consenso se basa, en un primer paso, en una técnica con un elevado VPN (GDH o TAAN) como método de cribado, descartando la ICD si el resultado es negativo. Si el resultado es positivo, en el segundo paso se debe realizar una técnica con elevado VPP (detección de toxinas por EIA), y si esta segunda técnica es también positiva, se confirma el diagnóstico de ICD. Si en cambio la segunda técnica es negativa, el diagnóstico depende de una evaluación clínica del paciente, pudiéndose tratar de una ICD con una baja carga bacteriana o tratarse de un portador de una cepa toxigénica. Si la técnica empleada en el primer paso fue la GDH, se puede realizar, en un tercer paso, un CT o TAAN para diferenciar entre una cepa toxigénica o no toxigénica (**Figura 9**).



**Figura 9.** Algoritmo diagnóstico de 2-3 pasos. Modificado de Alcalá L *et al.* (130).

No se deben repetir las pruebas en los 7 días posteriores a una petición previa, puesto que se ha comprobado que tiene escaso beneficio diagnóstico (198, 199), a menos que exista una fuerte sospecha clínica; tampoco está recomendado el procesamiento de muestras como control de eficacia del tratamiento (181). La determinación de toxina puede ser positiva por la presencia residual tras la resolución de la diarrea. Igualmente, un resultado negativo no descarta un estado de portador asintomático, como se comprobó en un estudio en el que el 56% de los pacientes que, habiendo respondido correctamente al tratamiento de la ICD, continuaron dispersando esporas de *C. difficile* entre 1 y 4 semanas (94).

Los estudios sugieren que existe un peor pronóstico si el diagnóstico se realiza mediante la detección de toxina y esta resulta positiva por inmunocromatografía (195–197), pero no se puede garantizar que esa asociación se vaya a cumplir en todos los casos. Hay pacientes con determinación de toxina directa positiva mediante inmunocromatografía que son portadores asintomáticos y pacientes diagnosticados en un tercer paso con TAAN, que resultan en casos graves o complicados (14, 200). Siempre será necesario interpretar los resultados del diagnóstico de laboratorio con la clínica que presente el paciente.

Por último, es importante tener en cuenta que no se deben procesar muestras de niños menores de 2 años debido a la alta prevalencia de portadores asintomáticos, tanto de cepas toxigénicas como no toxigénicas, en esta población (64, 201)(62).

### 2.3-TRATAMIENTO DE LA ICD

#### 2.3.1-Recomendaciones: Guías Europea y Americana

El tratamiento de la ICD depende de su gravedad, de si se trata de una recurrencia/reinfección y de la viabilidad del tratamiento oral. La guía clínica ESCMID para el tratamiento de *C. difficile* se publicó en el año 2014 (146) y se actualizó en el 2018 (147) al igual que la guía americana de la IDSA (63). En ambos documentos se recogen las siguientes recomendaciones de tratamiento:

- **Primer episodio de ICD, sin criterios de gravedad**

La recomendación en estos casos, si es posible, es la supresión durante 48 horas del tratamiento antibiótico que ha podido inducir la ICD y la observación del paciente. El tratamiento dirigido recomendado es metronidazol (500 mg, 3 veces al día, 10 días) o

vancomicina (125 mg, 4 veces al día, 10 días) por vía oral. La fidaxomicina por vía oral (200 mg, 2 veces al día, 10 días) también puede ser una alternativa, aunque generalmente este antibiótico se reserva para segundos/terceros episodios. En las últimas guías clínicas de la IDSA se ha eliminado el metronidazol como opción terapéutica (63), quedando relegado su uso solamente para cuando no se dispone de vancomicina o fidaxomicina.

- **ICD con criterios de gravedad**

La recomendación incluye vancomicina (125 mg, 4 veces al día, 10 días) o fidaxomicina (200 mg, 2 veces al día, 10 días) por vía oral, pero se puede considerar aumentar la dosis (de 125 mg a 500 mg, 4 veces al día, 10 días). En el caso de que no sea factible la vía oral, se debe usar metronidazol intravenoso (500 mg, 3 veces al día, 10 días) junto con vancomicina por vía nasogástrica (500 mg, 4 veces al día, 10 días), o bien con enema de vancomicina (500 mg en 100 ml de suero salino, 4 veces al día). En casos fulminantes que no responden a la terapia antibiótica o en caso de toxicidad sistémica, peritonitis y perforación intestinal, debe considerarse la intervención quirúrgica con resección colónica.

- **Primer episodio de ICDr**

Ante la recurrencia, se recomienda vancomicina oral (125 mg, 4 veces al día, 10 días) cuando en el primer episodio se empleó metronidazol, pero si en el primer episodio se usó vancomicina, en la recurrencia se deberá pautar fidaxomicina (200 mg, 2 veces al día, 10 días). La fidaxomicina ha demostrado tener tasas de recurrencias menores con respecto a las de vancomicina (166, 202).

- **Múltiples recurrencias de ICD**

Para posteriores episodios de recurrencia, la recomendación es fidaxomicina vía oral (200 mg, 2 veces al día, 10 días) o vancomicina vía oral (125 mg, 4 veces al día, 10 días) seguida de una terapia de vancomicina en pulsos (125-500 mg/día cada 2-3 días), o bien vancomicina (125 mg, 4 veces al día, 10 días) seguida de una terapia en táper (dosis decreciente de vancomicina). En el caso de ICDr tras distintos tratamientos antibióticos, tanto la guía americana como la europea recomiendan la transferencia de microbiota fecal (TMF) junto con antibioterapia oral.

### 2.3.2-Trasferencia de microbiota fecal (TMF)

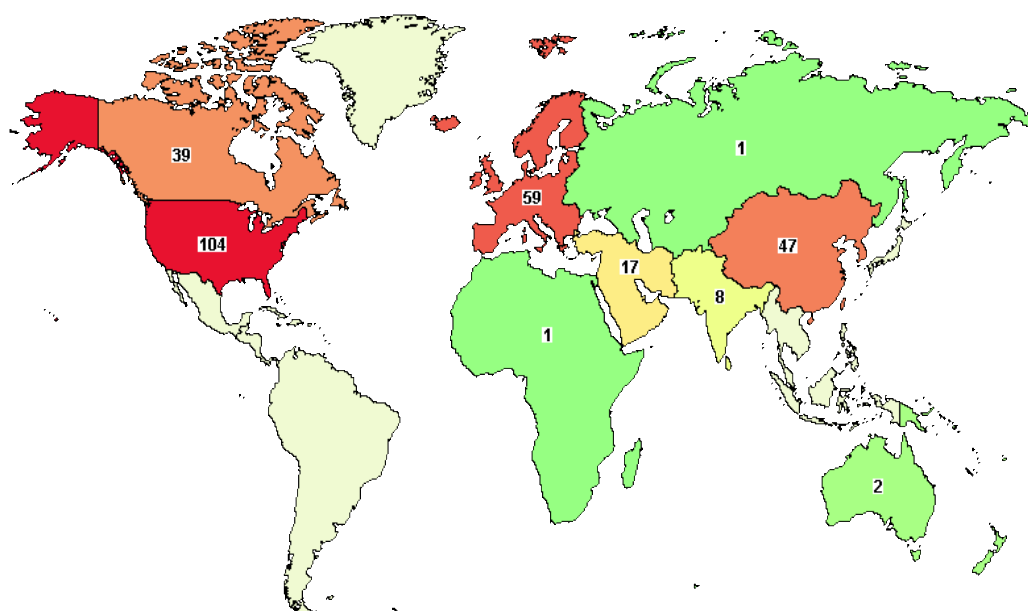
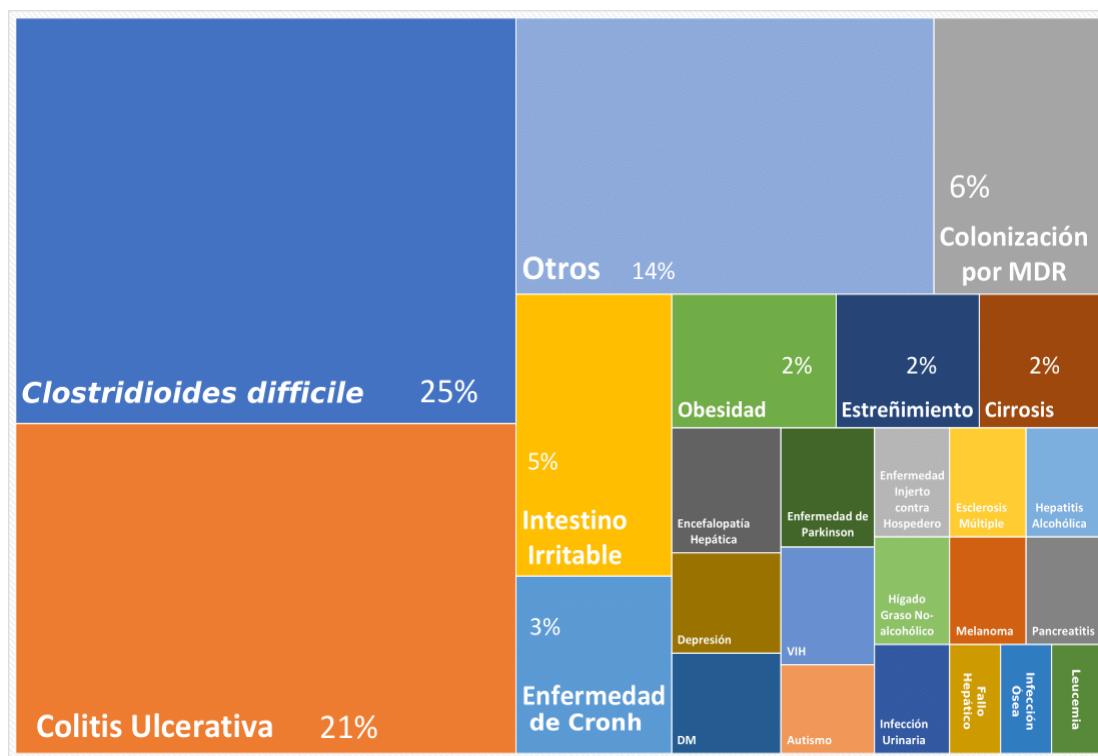
El valor del procedimiento de TMF ha acumulado evidencia científica en los últimos años y actualmente es la opción terapéutica más efectiva en el tratamiento de la ICDr (63, 146). En el año 2013, Van Nood *et al.* (16), publicaron el primer ensayo aleatorizado en el que se demostró la mayor eficacia de TMF (90%) frente a vancomicina (36%) para el tratamiento de la ICDr. Actualmente ya hay numerosas experiencias publicadas con tasas de curación entre el 80-90% (203, 204). El procedimiento consiste en la transferencia de un ecosistema microbiano completo y diverso desde un donante sano a un paciente con ICDr (205). La finalidad es la restauración o repoblación de la microbiota intestinal dañada por el proceso infectivo de *C. difficile*. No hay un procedimiento estandarizado, pudiéndose administrar a través del tracto digestivo superior (tubo duodenal o cápsulas orales) o del tracto digestivo inferior (mediante colonoscopia o enemas) (206). Tampoco hay consenso definitivo sobre si se deben utilizar deposiciones frescas o congeladas, pero ambas han demostrado buena eficacia (207). Las heces liofilizadas cuentan con menores cifras de éxito, pero son una alternativa al uso de procedimientos invasivos como la colonoscopia.

La ICDr es la única indicación del TMF pero es evidente que son numerosos los potenciales usos que puede tener este abordaje. Así, podría ser una terapia complementaria en el tratamiento de otras enfermedades en las que la disbiosis juega un papel importante y para las que ya se han comunicado resultados favorables, como la colitis ulcerosa (208–210), la enfermedad inflamatoria intestinal (211) o la encefalopatía hepática (212). También se han notificado casos de erradicación de bacterias multirresistentes tras un procedimiento de TMF para el tratamiento de la ICDr (Lagier *et al.* 2015), por lo que se postula su empleo frente a la colonización por estos microorganismos (215, 216).

Sin embargo, la TMF no es una técnica exenta de riesgos. El donante debe ser sometido a un riguroso cuestionario que avale sus hábitos de vida saludables, además de un exhaustivo examen serológico y pruebas de ausencia de bacterias multirresistentes, como se recoge en el consenso europeo publicado en el 2017 (206). Aun así, se han notificado en la literatura algunos efectos adversos, como infecciones producidas por microorganismos presentes en las heces del donante, como norovirus o *Clostridium perfringens*, entre otros (217–219).

## INTRODUCCIÓN

Con fecha de noviembre de 2019 se han registrado más de 200 ensayos en los que se utiliza TFM en diferentes patologías, como se puede observar en la siguiente figura (Figura 10).



**Figura 10.** Ensayos clínicos registrados mediante TFM para distintas patologías a fecha de noviembre de 2019. Fuente: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).



### 2.3.3-Nuevos tratamientos

En los últimos años han aparecido nuevas opciones terapéuticas para el manejo de la ICD. En algunos casos, aún no se han realizado ensayos clínicos prospectivos que avalen su eficacia o bien, se han completado durante o después de la elaboración de las guías, por lo que la recomendación de su uso no aparece reflejada en las mismas.

- **Anticuerpos monoclonales**

Actoxumab y bezlotoxumab son dos anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a las toxinas A y B de *C. difficile*, respectivamente (220). El uso de bezlotoxumab ha demostrado promover tasas de recurrencia menores, mientras que Actoxumab no demostró ser superior al placebo ni tampoco produjo un efecto aditivo en su empleo junto con bezlotoxumab (221). Por ello, bezlotoxumab ha sido el primer agente terapéutico que recibió la aprobación de uso para la prevención de la ICDr (222). La vía de administración es intravenosa y se emplea en combinación con vancomicina o fidaxomicina. El mecanismo de acción de bezlotoxumab consiste en la neutralización de la toxina B de *C. difficile* (223). Concretamente, bezlotoxumab se une con gran afinidad a dos epítomos del dominio CROP en el extremo N-terminal de la toxina B, lo que conduce a un bloqueo de los receptores de unión de la toxina, evitando por tanto su unión a las células del hospedero (224).

- **Cadazolid**

Cadazolid es el primer antibiótico de la clase quinoxolidinona, caracterizado por combinar grupos farmacóforos de las oxazolidinonas y de las quinolonas (225). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas y en menor medida, en la inhibición de la síntesis del ADN bacteriano (226). Cadazolid demostró una potente actividad *in vitro* frente a *C. difficile* (227, 228), sin embargo, uno de dos ensayos clínicos en fase III no ha logrado el objetivo principal de no inferioridad respecto a vancomicina (229), por lo que es una molécula que aún requiere más estudios para su uso en el tratamiento de la ICD.

- **Surotomicina**

Surotomicina es un nuevo lipopéptido cíclico oral derivado de la daptomicina, que presenta efecto bactericida frente a *C. difficile* y otros microorganismos grampositivos

(230). Ha demostrado ser activo *in vitro* frente a aislados de *C. difficile*, incluso en cepas con CMI elevadas a vancomicina y a metronidazol (231). También ha demostrado su eficacia en modelos de intestino *in vitro*, reduciendo el recuento de células viables de *C. difficile* y los niveles de toxina libre (232). Respecto a los resultados obtenidos en ensayos clínicos aleatorizados, surotomicina no ha demostrado ser no inferior a vancomicina (233, 234), frenando su posicionamiento como alternativa en el tratamiento de la ICD.

- **Ridinidazol**

Ridinidazol es un nuevo antibiótico heterocíclico que parece actuar afectando a la división celular de *C. difficile*, alargando la célula e inhibiendo la esporulación (235). Ha demostrado buena actividad en modelos animales y de intestino *in vitro* (236). En estudios de Fase II, ha demostrado mejor respuesta clínica que vancomicina y menores tasas de recurrencia (237). No hay aún disponibles resultados de estudios en fase III.

- **Vacunas**

En los últimos años se están desarrollando vacunas que puedan conferir inmunidad activa frente a las toxinas de *C. difficile*, con el objetivo de prevenir a largo plazo el desarrollo de ICD. En la actualidad hay 3 vacunas en desarrollo: i) de Sanofi Pasteur, a partir de la inactivación con formalina de las toxinas A y B: actualmente se ha frenado su desarrollo en fase III por estar lejos de cumplir el objetivo de prevención la ICD (238); ii) de Pfizer, en la que las toxinas están modificadas genéticamente: en estudio de fase III (239). iii) de Valneva, basada en una proteína recombinante que une los dominios C-terminal de las toxinas A y B: ha demostrado buena respuesta inmune y seguridad en los estudios de fase II, pero no se ha comenzado un estudio de fase III (239). De momento no hay ninguna vacuna comercializada (240).

## 2.4-EPIDEMIOLOGÍA E INCIDENCIA DE ICD

Desde principios del siglo XXI, la incidencia de ICD ha aumentado progresivamente en todo el mundo. En 2003 se notificó desde Canadá y EE.UU. un aumento no solo de la incidencia de ICD sino de la gravedad de los casos y las tasas de recurrencias, en gran parte por la irrupción del ribotipo hipervirulento 027 (32, 79, 241). Otros ribotipos también han demostrado gran capacidad de dispersión mundial como 078, 014/020 o

017 y además se notifican continuamente nuevos clones emergentes (p. ej., ribotipos 244 o 018).

### 2.4.1-Epidemiología e incidencia en Europa

En el estudio multicéntrico de Barbut *et al.* (14 países, año 2005) la incidencia media de ICD fue de 2,45 casos por 10.000 pacientes-día (rango 0,1-7,1) y los ribotipos mayoritarios el 001 y el 014/020. Las prevalencia de los ribotipos 027 y 078 fueron del 6,2 y 3%, respectivamente (242). Tres años más tarde, se realizó un nuevo estudio multicéntrico (34 países, año 2008) y se observó un aumento de la incidencia media por hospital, de 4,1 casos por 10.000 pacientes-día (rango 0,0-36,3) (83), que a su vez coincidía con aumentos de incidencia notificados en diferentes países en esa época, como Finlandia, Dinamarca o España (243–245). Los ribotipos mayoritarios también fueron 001 y 014/20 y la prevalencia del 027 fue algo menor (5%). Además, destaca el aumento de notificación del ribotipo 078 (8%) (83), lo que coincide con la descripción por parte de los investigadores holandeses, de un incremento de la ICD asociada al 078 entre los años 2005-2008 y la presencia del mismo en granjas de cerdos (39). Posteriormente, en el multicéntrico de Davies *et al.* (20 países. Años 2012-2013) también se observó un aumento de la incidencia media por países con respecto a los estudios anteriores, de 7,0 casos por 10.000 pacientes-día (rango 0,8-28,7) (246). Destaca en este trabajo, además del aumento de incidencia, que el ribotipo 027 fue el mayoritario (19%) (247). Aunque con importantes diferencias geográficas, ya que fue el mayoritario en Europa del Este y Oeste, pero no se encontró en los países del Norte (247).

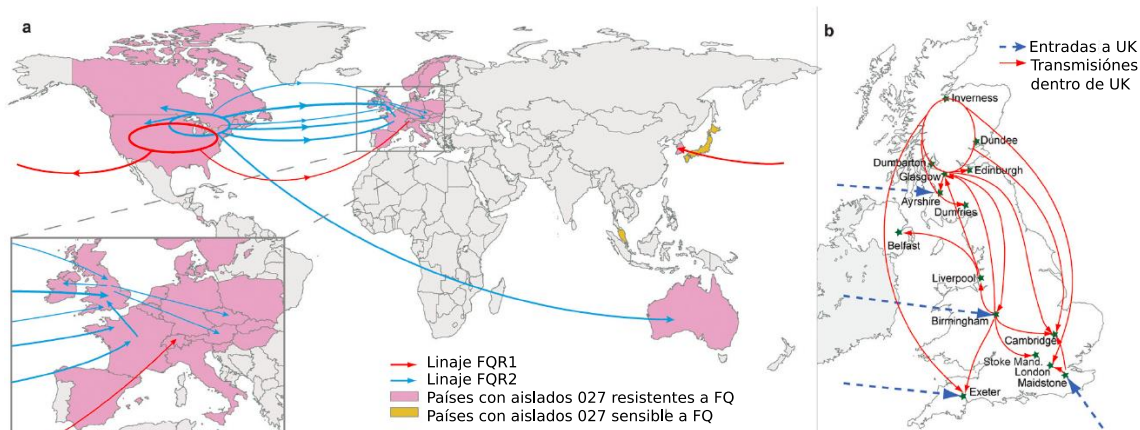
Actualmente el ribotipo 027 se ha extendido por todo el continente Europeo, notificándose brotes en diversos países como Holanda, España o Polonia (248–250) e incluso es el ribotipo más prevalente en algunos países como Portugal (251). Otros ribotipos causantes de brotes en Europa son el ribotipo 018, sobre todo en Italia (82, 252), el 018 en Alemania (253), el ribotipo 017 en Inglaterra (254), y otros ribotipos menos comunes como el 826, en Holanda (255).

### 2.4.2-Epidemiología e incidencia en América

La primera alarma sobre el cambio epidemiológico se originó en Canadá tras un análisis retrospectivo de todos los casos de ICD de Quebec donde se encontró un incremento de 5 veces en la incidencia, desde 35,6 casos por 100.000 habitantes en 1993, a 156,3 en

2003. Este aumento en el número de casos también se asoció con un aumento de casos graves (de 7,1% a 18,2%) y de mortalidad a los 30 días (de 4,7% a 13,8%) (152). En otro trabajo canadiense se notificó en 2005 una incidencia de 22,5 casos por 1.000 admisiones con una mortalidad del 6,9% (79). Al mismo tiempo, en EE.UU. también se notificó un aumento de la incidencia y la mortalidad entre 1997 y 2001 (149, 256). La caracterización de las cepas de estos trabajos reveló que tenían como característica común la resistencia a fluoroquinolonas y la producción de una toxina binaria, lo que supuso la descripción del ribotipo 027 (241, 257). A partir de la emergencia y distribución de este clon en Norte América, se produjo su dispersión global prácticamente por todo el mundo (**Figura 11**) (15). La ICD en 2007 en EE.UU. afectó a 300.000 pacientes y supuso 14.000 muertes (258, 259). En 2011 aumentó a 500.000 casos y 29.000 muertes (259), por lo que *C. difficile* es considerado el principal patógeno que causa infección nosocomial en EE.UU. (260).

La información sobre la incidencia de ICD en otros países del continente americano aparte de EE.UU. y Canadá es en general escasa y reducida a brotes hospitalarios. En Colombia (2013-2014, 3 hospitales 143 cepas estudiadas) se notificó el ribotipo 591 como el más prevalente, seguido del 106 y 002, encontrándose un único caso de 027 (261). En Costa Rica se ha descrito 027 y un brote por ribotipo 012, al que se le asoció una elevada virulencia (262, 263). También se ha reportado la presencia o brotes de 027 en Panamá (264), México (265) y Chile (266).



**Figura 11.** Eventos de transmisión inferidos del ribotipo epidémico 027. a) Dispersión global de los linajes resistentes a fluoroquinolonas (FQ), FQR1 (flechas rojas) y FQR2 (flechas azules). Países con presencia de 027, resistente o sensible a FQ. b) Llegadas inferidas (líneas azules) de FQR2 al Reino Unido (UK). Transmisiones entre el UK (líneas rojas). Adaptado de He *et al.* (15).

### 2.4.3-Epidemiología e incidencia en Asia, Australia y África

Los resultados de un metaanálisis en Asia durante 2000-2016 estimaron que la incidencia media era de 5,3 casos por 10.000 pacientes-día, con una mortalidad del 8,9%. La proporción de 027 solamente fue del 0,3%, mientras que el ribotipo más prevalente fue 017 (14%) (267). Posteriormente otros autores han descrito al ribotipo 017 como el mayoritario en Asia (268), causando brotes en Japón, Taiwán, Tailandia, China y Corea del Sur (269–272).

El 027 se notificó por primera vez en Australia en 2009, pero nunca ha sido predominante (273, 274), ya que dominan 014/020, 056 y 002 (275, 276). Sin embargo, en 2014, se describió la emergencia del ribotipo 244, productor de toxina binaria y relacionado genéticamente con el 027 (277).

En África los datos de ICD se reducen a comunicaciones en grupos particulares de pacientes o experiencias de únicos hospitales. En general se trata de una infección infradiagnosticada, por lo que hay una percepción de baja prevalencia. En Sudáfrica, en un estudio en dos centros especializados en tuberculosis, se documentó una prevalencia de 7 casos por 10.000 admisiones, causando el ribotipo 017 el 95% de los casos (278). En Nigeria, se documentó una prevalencia de 43% de ICD en una población de enfermos de VIH ingresados en un hospital (279). En Zimbabue, la prevalencia de *C.*

*difficile* toxigénico en pacientes ambulatorios con diarrea fue del 8,5% (280), mientras que en Tanzania en pacientes hospitalizados fue del 6,4% (281).

### 2.4.4-Epidemiología e incidencia en España

Al igual que en el resto de Europa, en España se ha notificado un importante aumento de la incidencia de ICD a partir del año 2000 (282), aunque aún se mantienen tasas inferiores a las de EE.UU. o Europa. Entre 1997 y 2005 se encontró una media 4,1 casos por 10.000 altas hospitalarias (2,5 veces más alto en el grupo >65 años respecto al de 45-64 años), con una tendencia anual creciente (243). Entre 1999 y 2007 también se registró un incremento de la prevalencia de ICD desde 3,9 a 12,2 casos por 10.000 pacientes hospitalizados (283). En el año 2007 se realizó un estudio multicéntrico, en el que la incidencia media en España fue de 17,1 casos por 10.000 ingresos (284). En 2012 se estimó que la ICD adquirida en el hospital fue de 2,4 casos por 1.000 ingresos y 3,8 por 10.000 pacientes-día (285). En ese mismo año, la media Europea fue de 7,0 casos por 10.000 pacientes-día (246). La incidencia en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), parece ser baja (0,34%) de acuerdo a un estudio multicéntrico con 26 UCIs (286).

La aplicación de técnicas de Biología Molecular en España, en general ha sido escasa, por lo que no podemos conocer con seguridad la prevalencia de los ribotipos hipervirulentos. En el año 2012, en un estudio multicéntrico español con participación de 118 laboratorios, no se detectó ningún caso de 027 (285), siendo los ribotipos más prevalentes el 001, 014 y el 078/126 (285). Tampoco se detectó 027 en España en los multicéntricos Europeos del 2008 y 2012-2013 (83, 247). Los primeros casos notificados de 027 en nuestro país datan de 2007 y correspondieron a una paciente trasladada desde un hospital de Inglaterra y una técnico que lo adquirió en el laboratorio, ambos en un hospital de Madrid (287), y se describió otro caso importado de 027 desde Portugal en otro hospital de Madrid (288).

En 2014 se documentó el primer brote de 027 en España, afectado a 141 pacientes en un mismo hospital (250). Recientemente se han publicado nuevos estudios epidemiológicos, con la notificación de un único caso de 027 y predominando los ribotipos 106, 078/126 o 014 (289, 290). En un multicéntrico en UCIs también se encontraron dos cepas (286) y se han comunicado casos puntuales o situaciones de brote en 3 hospitales de la Comunidad de Madrid y Canarias (Datos no publicados. Publicación online de comunicaciones aceptadas en congresos SEIMC (291–293).

### 2.5-PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ICD

El aumento global de la incidencia de la ICD junto con la alta morbilidad y mortalidad asociada a algunos de los ribotipos y grupos de pacientes, hacen necesaria la toma de medidas para limitar la ICD y reducir las tasas de infección nosocomial. La mayoría de los esfuerzos en la prevención se basan en el control de la transmisión a partir de los pacientes sintomáticos (68, 294). Se recomienda el uso de medidas de protección personal (batas y guantes desechables) y precauciones de contacto a toda persona que visite al enfermo (tanto personal sanitario como familiares) y las precauciones de contacto se deben mantener al menos hasta pasadas 48 horas desde la finalización de la diarrea (63). Es preferible además, que los pacientes se encuentren en habitaciones individuales y sobre todo, con acceso a un baño propio (295). El lavado de manos del personal sanitario es una medida fundamental para prevenir la transmisión y se debe realizar antes y después del contacto con el paciente, y en general, se recomienda el lavado de manos con agua y jabón en vez del empleo de productos con alcohol (63, 296). También se recomienda la limpieza de las manos de los pacientes y la ducha, puesto que se reduce la contaminación de las superficies a través de su piel y además, la posibilidad de recurrencia por medio de la contaminación con las mismas esporas (297, 298). En cuanto a las habitaciones de pacientes con ICD, se recomienda realizar limpieza diaria con un agente esporicida, así como en el momento del alta del paciente, ya que reduce las tasas de infección (299).

La búsqueda de *C. difficile* como método de cribado en pacientes asintomáticos no está recomendada y tampoco en personal sanitario (294). Sin embargo, la educación del personal sanitario es una de las mejores medidas de control y prevención de la ICD, con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre los reservorios y fuentes de transmisión. Estas medidas también se deben hacer extensivas al personal de limpieza y a las visitas y acompañantes del paciente (300).

Los programas de optimización de uso de los antibióticos (PROA, en España) son una herramienta efectiva en la prevención y control de la ICD (301); En sendos trabajos realizados en el Reino Unido basados en la restricción de ciertos antibióticos, se comprobó la reducción de las tasas de infección nosocomial y comunitarias (302, 303).





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Se ha comunicado un aumento considerable de la prevalencia de la ICD en diferentes países, y aunque parece que en España este aumento no es tan grande, la realidad es que no se ha analizado suficientemente y no se conocen bien los valores de prevalencia. Al inicio de esta Tesis Doctoral, en 2015, la epidemiología de la ICD no había sido suficientemente estudiada en nuestro Hospital, nuestra situación era aparentemente estable, sin brotes y con valores de incidencia estables en los últimos años. Sin embargo, existía la sospecha de que el ribotipo 027 pudiera ya estar en nuestro hospital, ya que se había detectado un brote importante en otro hospital de la Comunidad de Madrid, pero en aquel momento no se tipificaban las cepas y por tanto no había evidencia de la irrupción de dicho ribotipo.

Durante los inicios de esta Tesis también se publicó el primer ensayo clínico, llevado a cabo en Holanda, sobre la aplicabilidad de TMF en el tratamiento de la ICD. El Servicio de Microbiología, junto con el Servicio de Gastroenterología y Hepatología y el Servicio de Enfermedades Infecciosas, constituyeron entonces el primer grupo de trabajo que desarrolló e implantó un programa de TMF en nuestro país.

Así pues, la **Hipótesis** que nos planteamos en esta Tesis Doctoral fue que el ribotipo 027 podría causar ICD en nuestro Hospital y que deberíamos conocer sus rutas de transmisión y su epidemiología en nuestra institución.

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue implantar las técnicas de ribotipificación y de SGC para analizar la epidemiología molecular de *C. difficile* en nuestro hospital e investigar las posibles rutas de transmisión de este patógeno.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estimar la incidencia de ICD en nuestro hospital y describir su epidemiología.
2. Detectar los ribotipos emergentes o nuevos ribotipos.
3. Diferenciar entre recaída y reinfección en los episodios de ICDr.
4. Analizar la transmisión de *C. difficile* en el hospital, principalmente entre los ribotipos mayoritarios.
5. Participar en el protocolo de TMF implementado en nuestro hospital y estudiar los posibles efectos ecológicos de este procedimiento en la microbiota intestinal.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---



### 1 - Diseño y población de estudio

El estudio se realizó entre enero de 2013 y diciembre de 2018 en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, hospital terciario de la Comunidad de Madrid que atiende a una población aproximada de 560.000 habitantes. Se trató de un estudio descriptivo y retrospectivo, en el que se incluyó a todos los pacientes con diagnóstico de diarrea asociada a *C. difficile*. Se recogieron los datos demográficos (edad y sexo), servicio médico de ingreso, fecha de admisión y fecha de alta hospitalaria de los casos, empleando el sistema informático del Servicio de Microbiología y la historia clínica electrónica. En este estudio no se incluyó la recogida de datos clínicos, comorbilidades o factores de riesgo, puesto que la finalidad no consistía en la búsqueda de una presunta relación causa-efecto. El análisis de los datos fue descriptivo. Los valores de las variables fueron expresados como medias  $\pm$  desviación estándar (DE), medianas y rangos intercuartílicos (IQR) o porcentajes. El Comité de Ética de nuestro Hospital aprobó el estudio (no. 266-17), y el consentimiento informado de los pacientes no fue necesario, debido a que no hubo intervención clínica.

### 2 - Definición de caso, nuevo caso y recurrencia

Se definió como **caso** a todos los pacientes mayores de 2 años de edad que presentaron síntomas compatibles con ICD y en los que se obtuvo un resultado positivo en las pruebas de laboratorio para la detección de toxina de *C. difficile* en muestra de heces; como **episodio nuevo** a los pacientes con un primer episodio de ICD o bien si el episodio en estudio ocurría tras 8 semanas del episodio previo; y finalmente **recurrencia** a los episodios de ICD que transcurrieron entre 2 y 8 semanas posteriores a un episodio anterior de ICD.

### 3 - Diagnóstico de ICD

El método de cribado para la detección de *C. difficile* toxigénico consistió en la detección de GDH mediante EIA (C Diff Quik Chek, Techlab, Blacksburg VA, EEUU), descartándose la ICD en los casos con resultado negativo. Si la GDH fue positiva, se realizó la detección de toxina libre en las heces mediante EIA (TOX A/B Quik Chek, Techlab, Blacksburg VA, EEUU), confirmándose la ICD si el resultado fue positivo. En los casos en los que se obtuvo un resultado positivo en la GDH y negativo en la

determinación de toxina por EIA, se realizó un tercer paso en el que se estudió la presencia del gen que codifica la toxina B (*tcdB*) mediante TAAN (BD MAX Cdiff assay, BD Diagnostic, Franklin Lakes, NJ, EEUU). En todos los casos con resultado positivo para GDH, se realizó el cultivo de heces en el medio cromogénico específico *C. difficile* ChromID agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), realizándose la lectura de las placas a las 48 horas de incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Las colonias con morfología compatible con *C. difficile* se identificaron mediante MALDI-TOF MS (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania).

El flujo de trabajo establecido en nuestro laboratorio determina que los casos con toxina positiva se comunican al Servicio de Enfermedades Infecciosas (24 horas/7días), quien evalúa la mejor opción terapéutica para el paciente. Si el paciente se encuentra ingresado en el hospital, los casos se notifican también al Servicio donde se encuentre el paciente y al Servicio de Medicina Preventiva. Desde el año 2013, se llevan a cabo medidas que implican precauciones de contacto con los pacientes diagnosticados por ICD, y estas incluyen el aislamiento de los pacientes en habitaciones individuales con baño privado y el uso de precauciones de barrera (disposición de guantes y bata desechables en la entrada de la habitación). Entre los protocolos de limpieza, se incluye la desinfección con hipoclorito sódico (2,500 partes por millón) de paredes, suelo y fómites de las habitaciones.

### 4 – Origen del caso de ICD

El origen de la ICD viene determinado por el momento y lugar de aparición de los síntomas. En función de la fecha de admisión y del alta hospitalaria, de la fecha de diagnóstico de la ICD y de la existencia o no de estancias previas en una institución sanitaria, se emplea una definición de origen de la ICD previamente establecido (63, 181, 192). Se definieron las siguientes categorías: i) **HO** (ICD de adquisición hospitalaria e inicio en el hospital), ii) **CO-HCFA** (ICD de adquisición hospitalaria e inicio en la comunidad), iii) **CA** (ICD de adquisición en la comunidad) y iv) **indeterminado**, todas ellas representadas en la **Figura 12**. Por último, se empleó también el acrónimo **HA** (Adquisición hospitalaria) para englobar los casos HO y CO-HCFA.



- **HO:** Adquisición hospitalaria. Cuando el inicio de los síntomas tiene lugar en el hospital en el tercer día de ingreso o posterior.
- **CO-HCFA:** Adquisición hospitalaria de inicio en la comunidad. Aparición de los síntomas en la comunidad, dentro de las 4 semanas posteriores a la finalización de un ingreso hospitalario previo.
- **CA:** Adquisición en la comunidad. Los casos en los que no haya habido una estancia hospitalaria en las 12 semanas previas al inicio de los síntomas. Los síntomas pueden iniciarse en la comunidad o el mismo día del ingreso o en el día siguiente.
- **Indeterminado:** Aquellos casos en los que el paciente tuvo una estancia hospitalaria en el periodo de tiempo comprendido entre las 4 y 12 semanas previas del inicio de los síntomas.



**Figura 12.** Línea de tiempo que representa la clasificación del origen de la ICD con fines de vigilancia y control de infección. Los casos en los que la aparición de los síntomas se produce en la zona marcada con asterisco (\*), se clasifican como CO-HCFA si el paciente ha sido dado de alta de una institución sanitaria durante las 4 semanas previas, se clasifican como indeterminados si ha sido dado de alta entre las 4 y 12 semanas previas, o se clasifican como CA si el paciente no ha sido dado de alta en las 12 semanas previas. Modificado de Cohen *et al.* (181).

#### 4 – Incidencia de ICD, estancia hospitalaria y tiempo hasta el diagnóstico

Las tasas de ICD se determinaron calculando la densidad de incidencia de los casos relacionados con la adquisición hospitalaria de inicio en el hospital (HO). Se expresó por el número de pacientes por día.

- Densidad de incidencia de HO: Número de nuevos casos HO por 10.000 pacientes-día.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Se determinó la incidencia acumulada de los casos CO-HCFA, expresada por el número de admisiones.

- Incidencia acumulada de CO-HCFA: Número de nuevos casos CO-HCFA por 1.000 admisiones.

Se determinó la incidencia acumulada de los casos CA, expresada por el total de la población.

- Incidencia acumulada de CA: Número de nuevos casos CA por 100.000 habitantes.

Para el cálculo de los pacientes-día se consideró la suma de días en los que una cama estaba ocupada por un paciente hospitalizado. Se incluyeron todos los pacientes hospitalizados en el denominador, incluyendo niños menores de 2 años de edad. No se incluyeron pacientes del hospital de día que no pasaron la noche en el hospital, ni pacientes atendidos en el Servicio de Urgencias, ni los pacientes dializados.

En los casos clasificados como HO, se calculó la mediana de la estancia hospitalaria y la mediana del tiempo transcurrido entre la admisión hospitalaria y la aparición de la ICD.

En los casos clasificados como CO-CHFA, se calculó la mediana de la estancia hospitalaria que precedió a la ICD y la mediana del tiempo transcurrido entre el alta hospitalaria y la aparición de la ICD.

### 6 – Análisis molecular de los aislados clínicos de *C. difficile*

Siguiendo el algoritmo diagnóstico empleado durante el periodo de estudio, en los casos diagnosticados de ICD, se realizó el cultivo de la muestra de heces en medio cromogénico de *C. difficile*. Una vez identificados, los aislados fueron congelados en viales con leche semidesnatada. Posteriormente, en dichos aislados se testó la presencia de los genes que codifican las toxinas A (*tcdA*) y B (*tcdB*), la toxina binaria (*cdtA* y *cdtB*), el gen *tcdC* y deleciones en el gen *tcdC* mediante PCR. La amplificación de estos

genes se realizó empleando ADN genómico extraído con el kit comercial QiAmp (Qiagen GmbH, Hilden Alemania). Para dicha extracción, se partió de un inóculo bacteriano en medio líquido cerebro-corazón (BHI) incubado durante la noche anterior a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Como parte del protocolo de extracción del ADN, y para favorecer la ruptura celular, se realizó una digestión con lisozima y proteinasa K. El lisado bacteriano final se centrifugó y el sobrenadante se purificó mediante columnas de sílice. El ADN obtenido se eluyó en agua estéril. Los productos amplificados en todas las reacciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa disuelta en tampón TBE (0,5X) (Tris Borato, EDTA) y se visualizaron tras tinción con GelRed<sup>TM</sup> (Biotium, Hayward, CA, EE.UU.). A partir del mismo extracto genómico se realizó la ribotipificación de los aislados, mediante PCR y posterior electroforesis capilar.

### 6.1 – Detección de toxinas A, B y toxina binaria

La amplificación de los genes que codifican las toxinas A (*tcdA*), B (*tcdB*) y toxina binaria (CDT, *cdtA* y *cdtB*) se realizó siguiendo un protocolo de PCR múltiple previamente descrito (304). Los cebadores empleados (*tcdA*-F3345, *tcdA*-R3969, *tcdB*-F5670, *tcdB*-R6079A, *tcdB*-R6079B, *cdtA*-F739A, y *cdtA*-F739B) y las condiciones utilizadas se recogen en la **Tabla 3**. Se emplearon como controles 4 aislados previamente caracterizados y que correspondían a los ribotipos 001 (A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, CDT<sup>-</sup>), 014 (A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, CDT<sup>-</sup>), 078 (A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, CDT<sup>+</sup>) y 027 (A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, CDT<sup>+</sup>). Las cepas que no expresan la toxina A (por deleciones), no son identificadas con estos cebadores (ej. ribotipo 017).

### 6.2 – Detección del gen *tcdC*

El análisis del gen *tcdC* se realizó siguiendo el protocolo previamente publicado (305). Los cebadores (C1 y C2) y las condiciones utilizadas se recogen en la **Tabla 3**. Los fragmentos amplificados se secuenciaron con un analizador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) y las secuencias nucleotídicas se analizaron con el programa BLASTn (Nucleotide Collection database at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 6.3 – Análisis de las deleciones del gen *tcdC*

Las deleciones en el gen *tcdC* se caracterizaron con un protocolo ya descrito (306), y los cebadores (*tcdC*-F252 y *tcdC*-R415) y condiciones utilizadas se recogen en la **Tabla 3**.

Se emplearon como controles 4 aislados previamente caracterizados que se correspondían con los ribotipos 001 (sin delección), 014 (sin delección), 078 (delección de 39 pares de bases) y 027 (delección de 18 pares de bases).

### 6.4 – Ribotipificación mediante PCR y electroforesis capilar

La determinación de los ribotipos de los aislados de *C. difficile* se realizó siguiendo el protocolo de PCR descrito por Bidet *et al.* (134). El posterior análisis mediante electroforesis capilar se realizó siguiendo el protocolo de Fawley *et al.* (132). El cebador 16S se marcó en la posición final 5' con el fluoróforo 6-FAM. Los fragmentos obtenidos se analizaron empleando el analizador genético con electroforesis capilar ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Finalmente, el ribotipo se asignó empleando la base de datos WEBRIBO (<https://webribo.ages.at/>), que permite el análisis de los patrones de bandas obtenidos (136). Los cebadores empleados (16S y 23S) y las condiciones utilizadas se recogen en la **Tabla 3**. Se emplearon como controles 4 aislados previamente caracterizados que se correspondían con los ribotipos 001, 014, 078 y 027. Se definió la diversidad genética anual de los ribotipos causantes de ICD como el ratio entre el número de ribotipos diferentes en cada año de estudio y el número total de cepas analizadas en su año correspondiente. En los casos en los que se pudo comparar a nivel molecular las cepas causantes del episodio inicial con cepas causantes de episodios de ICD<sub>r</sub>, se determinó si la recurrencia se debió a un proceso de recidiva (mismo ribotipo) o reinfección (distinto ribotipo).

Para comparar la diversidad de ribotipos encontrados en cada año de estudio, ambiente hospitalario o comunitario y entre distintos grupos de edad, se empleó el índice recíproco de Simpson (307). El recíproco de Simpson asegura que el valor del índice aumente con el incremento de la diversidad. La fórmula empleada fue la siguiente:

- Índice de Simpson,  $D = 1 - \Sigma (n-1) / (N-1)$

- Índice recíproco de Simpson,  $1/D$

Siendo  $n$  el número de cepas de cada ribotipo y

$N$  el número total de cepas.

A mayor diversidad, mayor valor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 3.** Cebadores y condiciones empleados en el análisis molecular de los aislados de *C. difficile*.

GENES	CEBADORES	CONDICIONES
Toxinas		
tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	94°C, 3' (94°C, 50"; 56°C, 40"; 72°C, 50") x 35 72°C, 3'
tcdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	
tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	
tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	
tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	
cdtA-F739A	GGGAAGCACTATATTTAAAGCAGAAGC	
cdtA-F739B	GGGAAACATTATATTTAAAGCAGAAGC	
cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	
cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	
cdtB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	
tcdC		
C1	TTAATTAATTTTCTCTACAGCTATCC	94°C, 5' (94°C, 1'; 50°C, 1'; 72°C, 1')x 30 72°C, 3'
C2	TCTAATAAAAGGGAGATTGTATTATG	
Delección en tcdC		
tcdC-F252	CATGGTTCAAAATGAAAGACGAC	94°C, 3' (94°C, 50"; 56°C, 40"; 72°C, 50") x 35 72°C, 3'
tcdC-R415	GGTCATAAGTAATACCAGTATCATATCCTTTC	
Ribotipificación		
16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	95°C, 15' (95°C, 1'; 57°C, 1'; 72°C, 1') x 24 72°C, 30'
23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	

### 7 – Secuenciación de genoma completo (SGC)

La SGC de los aislados de *C. difficile* se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Ulrich Nübel, en el Instituto de Investigación Leibniz DSMZ, localizado en Braunschweig, Alemania. Los aislados en los que se realizó se seleccionaron de la siguiente manera:

- Aislados de los ribotipos de los que se habían encontrado 2 o más cepas durante el periodo de estudio entre enero de 2014 a diciembre de 2016, con el fin de establecer si existía relación clonal entre los aislados obtenidos de diferentes pacientes.
- Cepas de casos con ICDr (aislados iniciales y recurrentes), con el fin de establecer si la ICD recurrente se debía a casos de recidiva (mismo aislado) o reinfección (diferente).
- Finalmente, se incluyeron aislados de pacientes que habían sido tratados mediante TMF y que fueron obtenidos después del procedimiento, con el fin de conocer el estado de portador tras el TMF.

La SGC se realizó empleando ADN genómico extraído con el kit comercial DNeasy Blod & Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden Alemania). La preparación de las librerías de secuenciación se realizaron siguiendo el protocolo previamente descrito por Steglich *et al.* (308). La secuenciación se llevó a cabo con la tecnología Illumina NextSeq 500 y el kit Mid-Output (Illumina) con 300 ciclos. Las lecturas obtenidas tras la secuenciación se mapearon con el genoma de referencia de *C. difficile* R20291 (Ribotipo 027, secuencia con nº de acceso FN545816, del Archivo Europeo de Nucleótidos) usando el programa BWA-MEM (versión 0.7.12) (309). La variación en las secuencias se detectó empleando VarScan2 (versión 2.3) (308, 310). La variación en las secuencias producida por eventos de recombinación se detectó y eliminó mediante el análisis con ClonalFrameML (versión 1.11) (311). Posteriormente se determinó la distancia entre las secuencias mediante el análisis por pares de secuencias (312) y se construyeron árboles de máxima verosimilitud empleando los programas PhyML y Seaview 4 (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>).

Para calcular la proporción de las posibles transmisiones entre los casos de ICD, se consideraron los receptores de eventos de transmisión entre abril de 2014 y diciembre de 2016. Se excluyó el periodo de los tres primeros meses (enero-marzo de 2014), siguiendo un protocolo previo (312), debido a que la fuente de transmisión de ICD durante los tres primeros meses del estudio pudo haber tenido lugar en el año 2013 y por tanto no estar incluida entre los datos. Se consideró el punto de corte  $\leq 2$  SNPs propuesto por Eyre *et al.* (17), que determina que si en una pareja de genomas de 2 pacientes diferentes existe una diferencia  $\leq 2$  SNPs, esta relación es compatible con un evento de transmisión hospitalaria.

Se consideró **transmisión directa** si los eventos de transmisión ocurrieron entre pacientes que habían compartido tiempo y espacio en el hospital; mientras que se denominó como de **transmisión indirecta** a los siguientes casos: i) si los pacientes habían compartido tiempo en el hospital, pero encontrándose en diferente servicio médico; ii) si los pacientes compartieron servicio médico, pero en un momento diferente; iii) o si no compartieron tiempo ni espacio.

Este punto de corte ( $\leq 2$  SNPs) también se aplicó para distinguir entre los episodios de recurrencia (recidiva o reinfección) de los pacientes en los que se estudió más de un aislado de *C. difficile* y para describir la persistencia o no de la misma cepa

de *C. difficile* tras la realización de un TMF. Todos los genomas secuenciados se pueden encontrar en el European Nucleotide Archive ([www.ebi.ac.uk/ena](http://www.ebi.ac.uk/ena)) con el nombre de **estudio PRJEB28391**.

### 8 – Estudio molecular de un brote de ICD causado por el ribotipo 018

En julio de 2013 se detectó un clúster de casos de ICD en el Servicio de Gastroenterología de nuestro Hospital. En aquel momento, por mediación del Servicio de Medicina Preventiva, se implantaron medidas de control para minimizar la transmisión, que incluyeron: i) adopción de precauciones de transmisión por contacto de pacientes ante sospecha o confirmación de ICD, ii) limpieza y desinfección exhaustiva de toda la unidad con hipoclorito sódico (5.000 ppm), iii) sesiones de información a los profesionales con refuerzo de higiene de manos con agua y jabón antiséptico de clorhexidina-4%, iv) vigilancia activa para detección precoz de nuevos casos y v) control de reingresos con aislamiento preventivo.

Como parte del estudio molecular de los casos de ICD en la presente Tesis Doctoral (2013–2018), estuvieron incluidos los aislados que produjeron el brote de Gastroenterología en el año 2013. Se realizó la ribotipificación por PCR y posterior electroforesis capilar y se secuenció el genoma completo de parte de los aislados, siguiendo la metodología descrita en el apartado 7. Estos aislados no se incluyeron en los cálculos de la frecuencia y rutas de transmisión descritos en el capítulo 2 de resultados, por no pertenecer al periodo 2014-2016.

### 9 – Transferencia de microbiota fecal (TMF)

En marzo de 2015 se creó el Comité de TMF en nuestro Hospital que está compuesto por un equipo multidisciplinario que engloba al Servicio de Enfermedades Infecciosas (Dr. Javier Cobo), al Servicio de Gastroenterología y Hepatología (Dr. Antonio López-Sanromán, Dr. José Ramón Foruny, Dra. Beatriz Peñas, y Dra. Ana García) y al Servicio de Microbiología y Parasitología (Dra. Rosa del Campo). Este comité sigue las recomendaciones establecidas por las guías europeas para el TMF en ICDr, y es importante resaltar que el Dr. López-Sanromán participó activamente en la creación de dichas guías (206).





## **RESULTADOS**

---



## RESULTADOS

---

Los resultados de este trabajo se han estructurado en los siguientes capítulos:

- En el **primer capítulo** describimos de forma retrospectiva la incidencia de ICD en nuestro Hospital durante un periodo de 6 años (2013-2018), junto con los datos epidemiológicos, las variables demográficas, y los estudios moleculares analizados en dicha patología.
- En el **segundo capítulo**, mediante la aplicación de la SGC, se analizan las rutas y frecuencias de transmisión de los principales ribotipos identificados durante 3 años (2014-2016). Del mismo modo se incluye la descripción y el estudio molecular de un brote ocurrido en el Servicio de Gastroenterología en el año 2013.
- En el **tercer capítulo** se desarrolla la implementación de la TMF como herramienta ecológica en Microbiología para el tratamiento de la ICDr. Se adjunta el protocolo puesto a punto en este Servicio, los principales resultados de las intervenciones realizadas y se documenta el primer caso de erradicación de un microorganismo multirresistente tras TMF en España.

## RESULTADOS

---

### CAPÍTULO 1: Epidemiología de la ICD (2013-2018)

#### 1.1 Descriptivo casos totales

Durante los 72 meses en los que se realizó el estudio (2013-2018) se recibieron en el Servicio de Microbiología 18.341 muestras de heces de pacientes con diarrea, para el diagnóstico de ICD (**Tabla 4**). Se observó un aumento progresivo del número de peticiones desde el primer año de estudio (desde 2096 peticiones anuales hasta >3700). Este aumento es más evidente si se remonta a años previos del estudio, no incluidos en el presente trabajo (p. ej., año 2009, 1733 determinaciones; año 2010, 1880, determinaciones). La diferencia en el número de peticiones entre el año 2009 y el 2018 supone un incremento del 116,4%.

La determinación de toxinas aumentó en el año 2012, con respecto a los años anteriores (2009-2011, datos no incluidos), coincidiendo con la introducción del diagnóstico mediante inmunocromatografía. Posteriormente, volvió a aumentar a partir del año 2014, con la introducción de la técnica molecular del Sistema BD MAX en la rutina diagnóstica. Sin embargo, el porcentaje de resultados positivos se mantuvo en una media constante, en torno al 8,0%. (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Datos del diagnóstico de laboratorio de ICD.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018
<b>Nº de determinaciones de ICD analizadas</b>	2096	2613	3196	3526	3250	3750
<b>Cultivo positivo (%)</b>	177 (8,4)	176 (6,7)	200 (6,3)	225 (6,4)	199 (6,1)	286 (7,6)
<sup>a</sup> <b>GDH positivo por EIA (%)</b>	294 (14,0)	302 (11,6)	326 (10,2)	374 (10,6)	297 (9,1)	373 (9,9)
<sup>b</sup> <b>Toxinas A/B positivo por EIA (%)</b>	172 (8,2)	120 (4,6)	131 (4,1)	158 (4,5)	129 (3,9)	129 (3,4)
<sup>c</sup> <b>Toxinas A/B negativo por EIA/ Toxina B positiva por PCR (%)</b>	-	83 (3,2)	104 (3,2)	139 (3,9)	106 (3,3)	176 (4,7)

GDH: glutamato deshidrogenasa, EIA: enzima inmunoensayo, PCR: reacción en cadena de la polimerasa

<sup>a</sup> GDH por EIA desde mayo de 2012

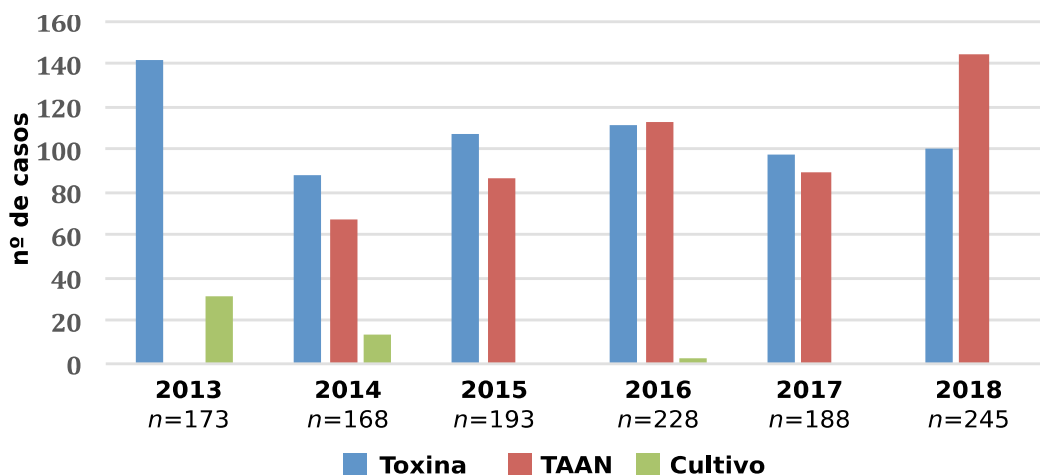
<sup>b</sup> Toxina por EIA desde mayo de 2012

<sup>c</sup> PCR disponible desde abril del 2014

## RESULTADOS

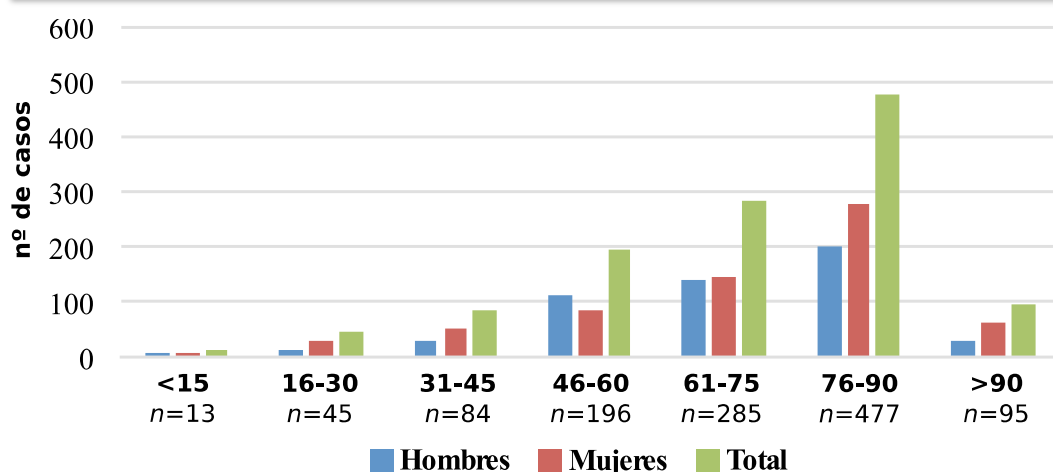
Tras la eliminación de peticiones duplicadas y casos considerados como recurrencias, finalmente, fueron identificados 1.195 nuevos casos de ICD durante el periodo de estudio. Los pacientes fueron diagnosticados mediante la detección de toxina directa (GDH y toxina positivos) en el 54,2% de los casos ( $n=648$ ) mientras que el 41,8% ( $n=500$ ), fue diagnosticado mediante técnica molecular (GDH positivo/toxina negativa/TAAN positivo). Además, el 3,9% ( $n=47$ ) fue diagnosticado mediante cultivo toxigénico. Este último grupo de pacientes corresponde mayormente al año 2013 y principios del 2014, cuando aún no se disponía de una técnica de diagnóstico molecular en el Servicio de Microbiología (**Figura 13**).

El 55,6% ( $n=664$ ) de los pacientes fueron mujeres. La edad media de estos fue de 69,4 años ( $\pm 18,83$ ), siendo la edad media en las mujeres de 70,1 años ( $\pm 18,85$ ) y en los varones de 68,7 años ( $\pm 18,83$ ). El 47,9% de los pacientes eran mayores de 75 años, mientras que los pacientes con una edad igual o menor de 15 años representaron el 1,1% de los casos. El grupo de edad que aportó mayor número de pacientes fue el de 76 a 90 años (39,9%,  $n=477$ ), seguido del grupo de 61 a 75 años (23,9%,  $n=285$ ) (**Figura 14**).



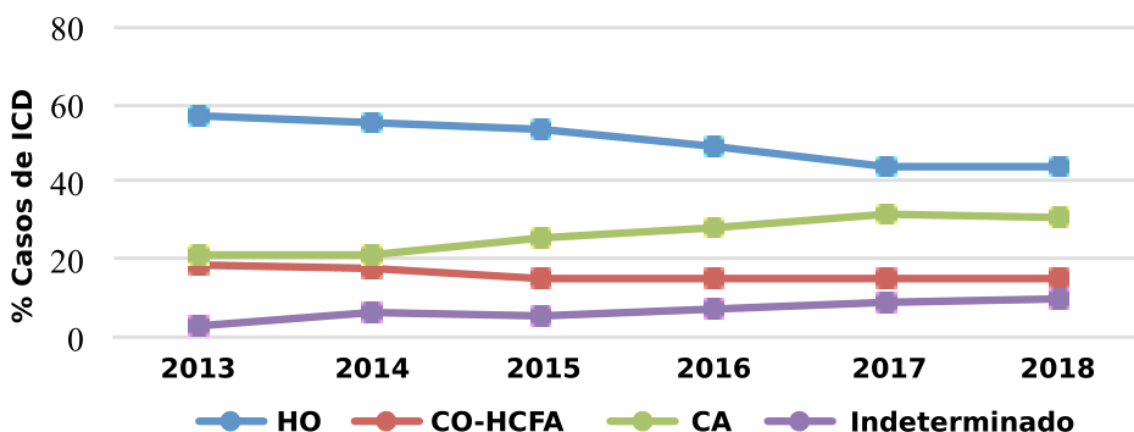
**Figura 13.** Casos anuales de ICD según método diagnóstico.

## RESULTADOS



**Figura 14.** Distribución de los casos totales de ICD por grupos de edad.

La mayoría de los casos (65,9%) se relacionaron con la asistencia sanitaria, siendo el 50,0% HO y el 16,0% CO-HCFA. Los casos asociados a la comunidad representaron el 26,9%, mientras que el 7,1% se clasificaron como indeterminados. La proporción de casos comunitarios aumentó con los años (del 21,4% en 2013, al 30,6% en 2018), mientras que descendió en los casos HO (del 57,2% en 2013, al 44,1% en 2018). También aumentó la frecuencia de casos clasificados como indeterminados (del 2,9% en 2013, al 10,2% en 2018) (**Figura 15**).

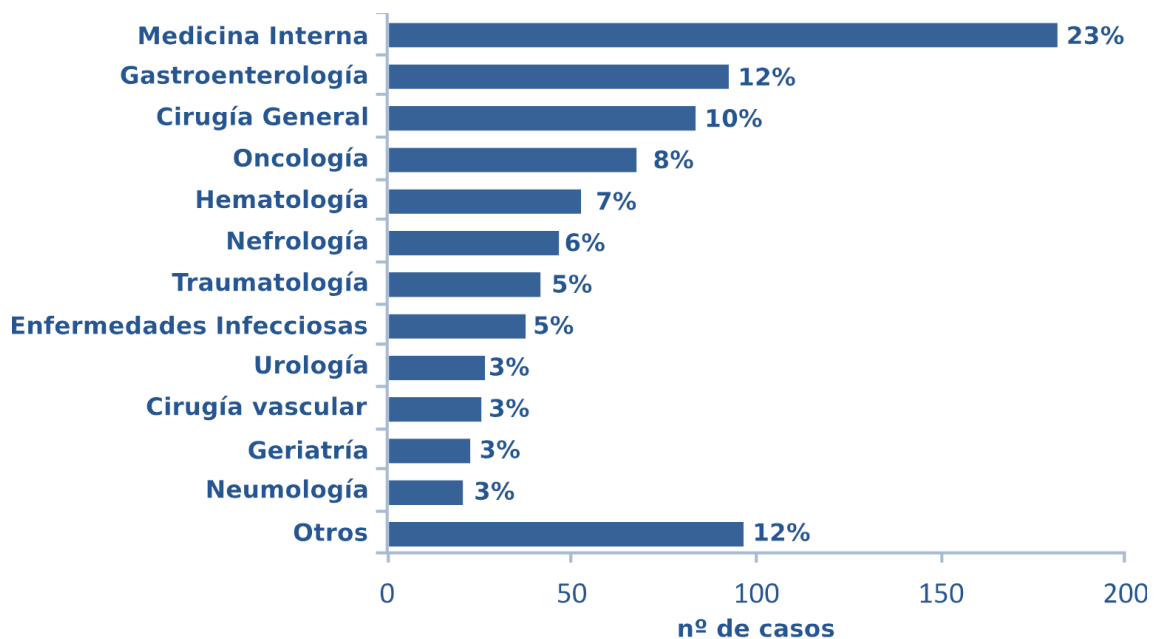


**Figura 15.** Distribución de los casos según lugar de adquisición. HO: Adquisición hospitalaria de inicio en el hospital. CO-HCFA: Adquisición hospitalaria de inicio en la comunidad. CA: Adquisición en la comunidad.



## RESULTADOS

Los casos de adquisición hospitalaria (HA) se detectaron en 30 Servicios Médicos diferentes, siendo el más frecuente el Servicio de Medicina Interna (23,0%; 181 casos), seguido de Gastroenterología (11,7%; 92 casos), Cirugía General (10,5%; 83 casos) y Oncología (8,5%; 67 casos). El resto de casos correspondió a los Servicios de Hematología (6,6%), Nefrología (5,8%), Traumatología (5,2%) y Enfermedades Infecciosas (4,7%). Servicios menos representados, se muestran en la **Figura 16**. La mayoría de los casos (70,0%;) se produjeron en los Servicios de Especialidades Médicas. En los Servicios de Especialidades Quirúrgicas se registró el 25,1%, mientras que en las UCIs el 3,4%. En los casos HO la estancia hospitalaria fue de 19 días (IQR, 11-34), con un período de 9 días (IQR, 9-17) desde el ingreso hasta el desarrollo y diagnóstico de la ICD. Cuando la enfermedad era de adquisición hospitalaria pero su inicio ocurría en la comunidad (CO-HCFA), la estancia hospitalaria era de 9 días (IQR, 5-16,5 con una mediana de 12 días (IQR, 7-20 días) desde el alta hospitalaria hasta el diagnóstico de la ICD.



**Figura 16.** Distribución por servicios médicos de los casos de adquisición hospitalaria. En Otros se agrupan los siguientes servicios, ordenados por número de casos: Cardiología, UCI-médica, UCI-quirúrgica, Cirugía Cardíaca, Neurocirugía, Neurología, Reumatología, UCI-Coronaria, Cirugía Plástica, Ginecología, Cirugía Maxilofacial, Pediatría, Endocrinología, Dermatología, Otorrinolaringología, UCI-Pediátrica.

## RESULTADOS

---

Durante los años de estudio (2013-2018) el número total de estancias en el hospital fue de 1.420.027, mientras que el número de pacientes ingresados fue de 190.745. La población que atiende el Hospital Universitario Ramón y Cajal es aproximadamente de 560.000 habitantes. El análisis de los resultados nos mostró que la densidad de incidencia global de ICD de los casos HO fue de 4,2 por 10.000 pacientes-día, en los casos CO-HCFA de 1,0 por 1.000 admisiones, y los CA de 9,6 por 100.000 habitantes (**Tabla 5**). Globalmente, se observó un aumento, tanto en los casos relacionados con la asistencia sanitaria (HO y CO-HCFA), como en los casos adquiridos en la comunidad (CA). Los casos HO aumentaron durante el periodo de estudio, desde los 3,9 a los 4,8 casos por 10.000 pacientes-día en los años 2013 a 2018, respectivamente. La incidencia acumulada de casos CO-HCFA se mantuvo prácticamente constante. El mayor aumento se observó en la incidencia acumulada de casos CA, con un incremento desde los 6,6 a los 13,4 casos por 100.000 habitantes.

RESULTADOS

Tabla 5. Incidencia de la ICD.

Año	Casos	HO	CO-HCFA	CA	Pacientes-días	Admisiones	Población	DI HO	IA CO-HCFA	IA CA
2013	173	99	32	37	254.236	31.743	560.000	3,9	1,0	6,6
2014	168	93	29	35	243.709	32.179	560.000	3,8	0,9	6,25
2015	193	104	29	50	238.931	31.253	560.000	4,3	0,9	8,9
2016	228	111	35	65	231.684	31.847	560.000	4,8	1,1	11,6
2017	188	82	29	60	227.868	31.847	560.000	3,6	0,9	10,7
2018	245	108	37	75	223.599	31.876	560.000	4,8	1,2	13,4
Total	1195	597	191	322	1.420.027	190.745	3.360.000	4,2	1,0	9,6
DI, Densidad de incidencia										
IA, Incidencia acumulada										

## RESULTADOS

Durante los 6 años de estudio, un total de 197 casos cumplieron la definición de episodio de ICDr (reaparición de diarrea con un test de diagnóstico positivo) entre las 2 y las 8 semanas posteriores a un episodio de ICD previo. La proporción de pacientes con ICDr fue del 16,5%, similar entre hombres (16,6%) y mujeres (16,4%). El año con mayor proporción fue 2014 (19,1%), mientras que el año con menor proporción fue 2013 (11,6%). La mediana de días transcurridos entre el episodio inicial de ICD y el de ICDr fue de 27 días (IQR, 21-35). La mayoría de los episodios de ICDr ocurrieron durante la 3ª (22,9%) y la 4ª (28,9%) semana. En 46 pacientes (23,3%) se produjo un segundo episodio de ICDr, siendo la mediana de días transcurridos entre el primer episodio de ICDr y el segundo de 29,5 días (IQR, 24-38). En 11 (23,9%) pacientes ocurrió un tercer episodio de ICDr, y finalmente, un paciente presentó 4 episodios y otro paciente, 7 episodios.

### 1.2- Epidemiología molecular de la ICD (2013 – 2018)

De los 1.195 casos detectados, se realizó una selección en base a los criterios explicados en la sección de Material y Métodos, realizando la caracterización molecular de 760 aislados de diferentes episodios de infección (63,6%). La distribución de los aislados estudiados durante los 6 años de estudio fue homogénea, correspondiendo al 64,0% de los casos de adquisición hospitalaria y al 61,8% de los casos comunitarios (**Tabla 6**).

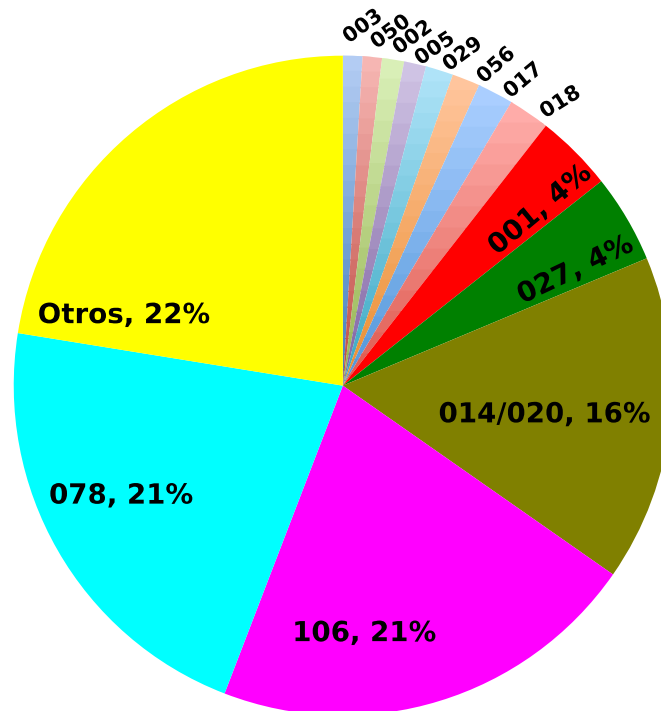
**Tabla 6.** Distribución de los aislados caracterizados molecularmente por año de estudio respecto al total de casos anuales.

	Total casos	Casos Caracterizados	Porcentaje (%)
2013	173	92	53,2
2014	168	104	61,9
2015	193	122	63,2
2016	228	140	61,4
2017	188	123	65,4
2018	245	179	73,1
Total	1195	760	63,6

## RESULTADOS

### Distribución global de los ribotipos de *C. difficile*

Los 760 aislados de *C. difficile* estudiados se agruparon en 124 ribotipos, lo que indica una elevada diversidad genética entre nuestra población. Es importante destacar que el 64,7% de todos los casos de ICD diagnosticados en nuestro centro correspondieron a 5 ribotipos (078, 106, 014/20, 027 y 001), mientras que por el contrario, otros 70 ribotipos diferentes estuvieron representados únicamente por un aislado (**Figura 17**). El 27,6% ( $n=210$ ) de los aislados portaba genes para la producción de toxina binaria. Los ribotipos 027, 176 y AI-33 presentaron una delección de 18pb en el gen *tcdC*; los ribotipos 078, 066, 229 y 413 una delección de 39pb y los ribotipos 023 y 438, una delección de 54pb.

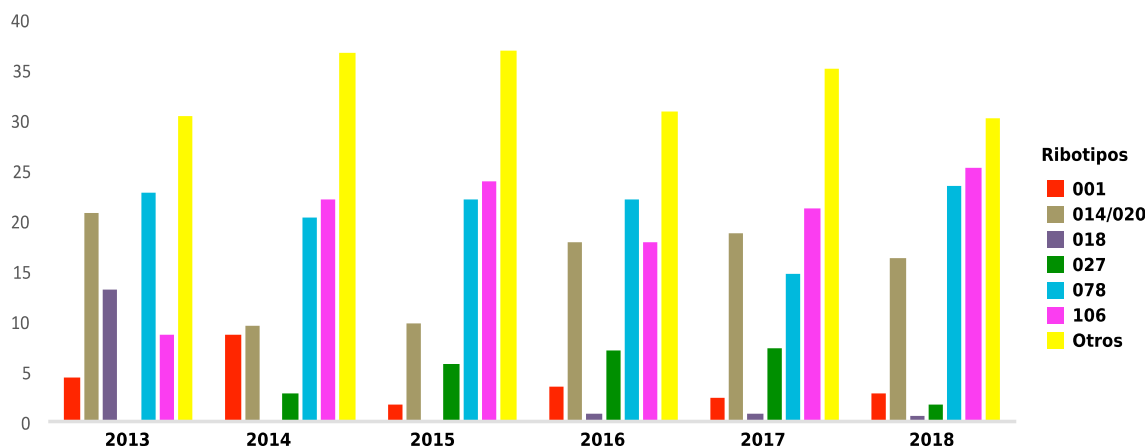


**Figura 17.** Distribución global de los ribotipos. Se representan los que tienen al menos un número igual o mayor a 7 aislados. En Otros se engloban 4 ribotipos con 6 aislados cada uno, 2 con 5, 2 con 4, 10 con 3, 24 con 2 y 70 ribotipos representados únicamente por un aislado.

## RESULTADOS

### Distribución anual

El predominio de los 5 ribotipos mayoritarios fue constante si bien con pequeñas variaciones en cada año. La excepción se encontró en el año 2013, donde el ribotipo 018 se aisló con una frecuencia del 13,0% ( $n=15$ ), situándose como el tercer ribotipo más prevalente en ese año; además no se detectó ningún aislado del ribotipo 027 (**Figura 18**).



**Figura 18.** Distribución de los principales ribotipos por año de estudio.

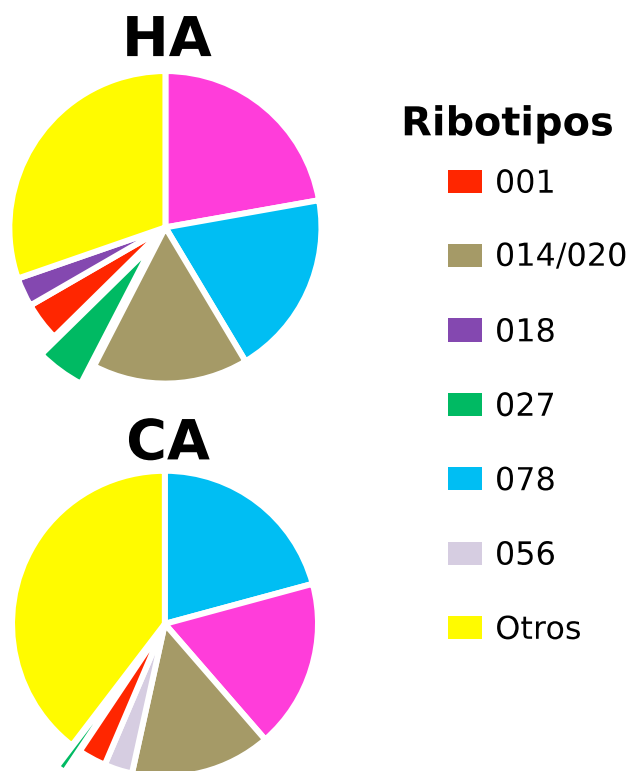
La diversidad de ribotipos en cada año de estudio, expresada mediante el índice recíproco de Simpson, respecto del total de cepas analizadas, se recoge en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Diversidad de ribotipos.

nº	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
<b>Cepas estudiadas</b>	92	104	122	140	123	179	760
<b>RT diferentes</b>	27	35	37	40	37	47	124
<sup>a</sup> <b>RT únicos</b>	18	25	22	27	26	33	70
<sup>b</sup> <b>Diversidad de RT</b>	8,54	9,59	8,56	8,61	9,43	6,95	8,71
<sup>a</sup> Ribotipos (RT) representados por un único aislado							
<sup>b</sup> Índice recíproco de Simpson. El valor del índice aumenta con el incremento de la diversidad							

### Distribución por lugar de adquisición

La proporción de los ribotipos mayoritarios fue semejante entre los casos de HA ( $n=504$ ) y los CA ( $n=199$ ), a excepción del ribotipo 027 que solamente se encontró en un único caso comunitario y del ribotipo 018, causante de un brote en 2013 (comentado en el capítulo 2). Los 5 ribotipos principales causaron el 66,7% y el 56,8% de los casos en el ambiente hospitalario y en la comunidad, respectivamente (**Figura 19**). En la comunidad se observó una mayor diversidad de ribotipos (62 ribotipos diferentes en 199 cepas; índice recíproco de Simpson, 10,11), que en el hospital (91 ribotipos diferentes en 504 cepas; índice recíproco de Simpson, 8,79). El número de ribotipos con representación de un único aislado también fue mayor en el ámbito comunitario (42/62, 67,7%; *versus* 55/91, 60,4%, respectivamente). El ribotipo con mayor presencia en Servicios Médicos diferentes fue 014/020 (23 servicios), seguido de 106 y 078 (18 y 17 servicios, respectivamente), 027 se identificó en 10 y el ribotipo 001 en 9 Servicios Médicos.

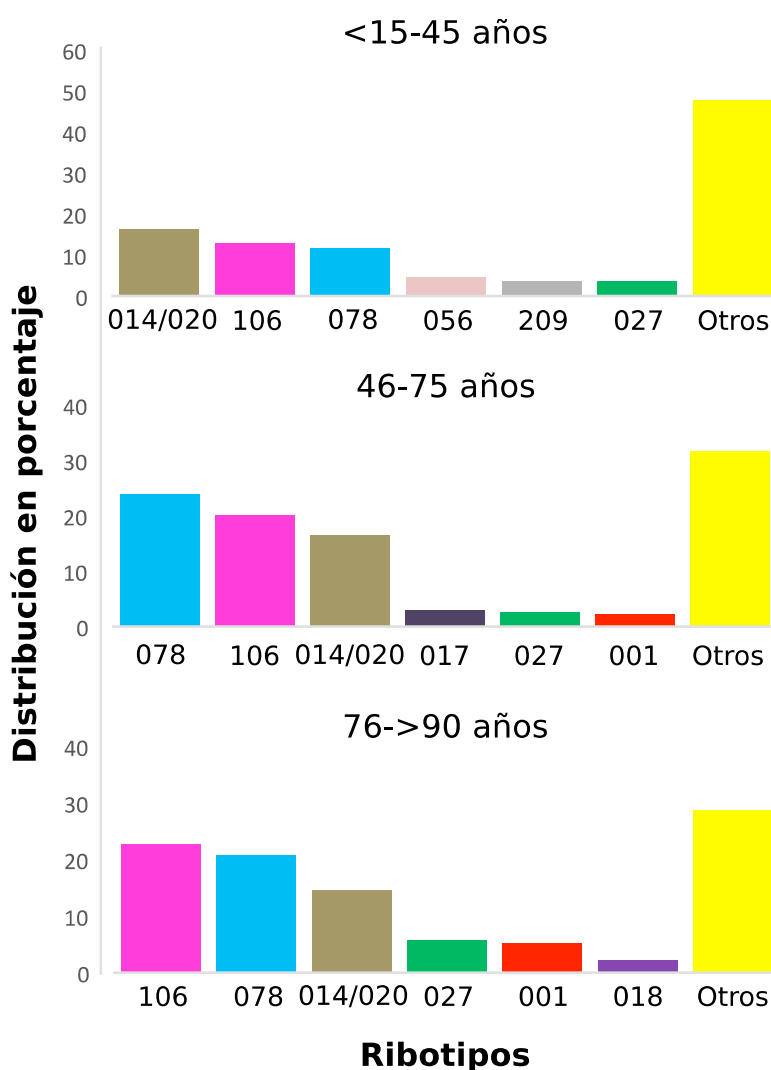


**Figura 19.** Distribución de los ribotipos mayoritarios en el ambiente hospitalario (HA,  $n=504$ ) y comunitario (CA,  $n=199$ ).

## RESULTADOS

### Distribución por grupos de edad

Se establecieron 3 grupos de edad que fueron los siguientes:  $\leq 45$  años ( $n=86$ ), de 46 a 75 años ( $n=309$ ) y  $\geq 75$  años ( $n=365$ ). (**Figura 20**). Nuevamente, los ribotipos mayoritarios a nivel global, también fueron los más habituales por grupos de edad, con algunas variaciones. El ribotipo 027 se distribuyó en todos los grupos etarios a partir de 30 años,  $< 45$  años (3,5%), 46-75 años (2,6%) y  $> 76$  años (5,8%). Se encontró la mayor diversidad de ribotipos en el grupo de edad más joven ( $\leq 45$  años, índice recíproco de Simpson, 17,6). La diversidad en los grupos de 46 a 75 años y  $\geq 75$  años fue semejante, 7,9 y 8,1; respectivamente.



**Figura 20.** Los gráficos muestran la distribución porcentual de los ribotipos mayoritarios clasificados por grupos de edad:  $<15-45$  años ( $n=86$ ), 46-75 años ( $n=309$ ) y 76->90 años ( $n=365$ ).



## RESULTADOS

### Ribotipado de casos de Recurrencia. Distinción entre recidiva y reinfección.

En 48 pacientes fue posible caracterizar molecularmente la cepa de *C. difficile* aislada tanto del episodio de ICD inicial como la cepa del episodio de ICDr. Además, en 10 pacientes también se pudieron estudiar las cepas obtenidas durante el segundo y/o tercer episodio de ICDr. Los resultados mostraron que en 37 casos (77,1%) ambas cepas pertenecían al mismo ribotipo, por lo que se consideraron como **recidivas** (Tabla 8). En 8 casos (22,9%) el ribotipo causante de la ICDr no coincidió con el del episodio inicial y se consideraron **reinfecciones** (Tabla 9). En las recidivas transcurrió una mediana de 29 días (IQR, 22-34) entre el episodio inicial y el primer episodio de ICDr, mientras que en las reinfecciones transcurrió una mediana de 26 días (IQR, 18-45).

**Tabla 8.** Recidivas de ICD.

<sup>a,b</sup> Pacientes, n°	Ribotipo
1	002
1	003
4	014/020
1	017
5	027
1	029
3	050
1	056
7	078
11	106
1	610
1	626
<sup>a</sup> Pacientes con el mismo ribotipo obtenido en el episodio de ICD y ICDr.	
<sup>b</sup> En algunos casos (n=7) se estudiaron múltiples recidivas por el mismo ribotipo [027 (n=3), 050 (n=2), 078 (n=1), 106 (n=1)].	

## RESULTADOS

**Tabla 9.** Reinfecciones de ICD.

<sup>a</sup> Pacientes, n°	Ribotipos	
	ICD_Inicial	<sup>b</sup> ICD_Rec
1	014/020	464- <sup>c</sup> NA-014/020
1	043	NA-078
1	045	078
1	047	106
1	078	29
<sup>d</sup> 1	078	106-106-106
1	078	34
1	078	106
1	176	106
1	413	014/020
1	471	AI-56
<sup>a</sup> Pacientes con distinto ribotipo obtenido en el episodio de ICD y ICDr		
<sup>b</sup> ICD_Rec: En algunos casos se incluyen múltiples recurrencias		
<sup>c</sup> NA, cepa no analizada		
<sup>d</sup> Los episodios de ICDr causados por el ribotipo 106 serían considerados como recidivas		

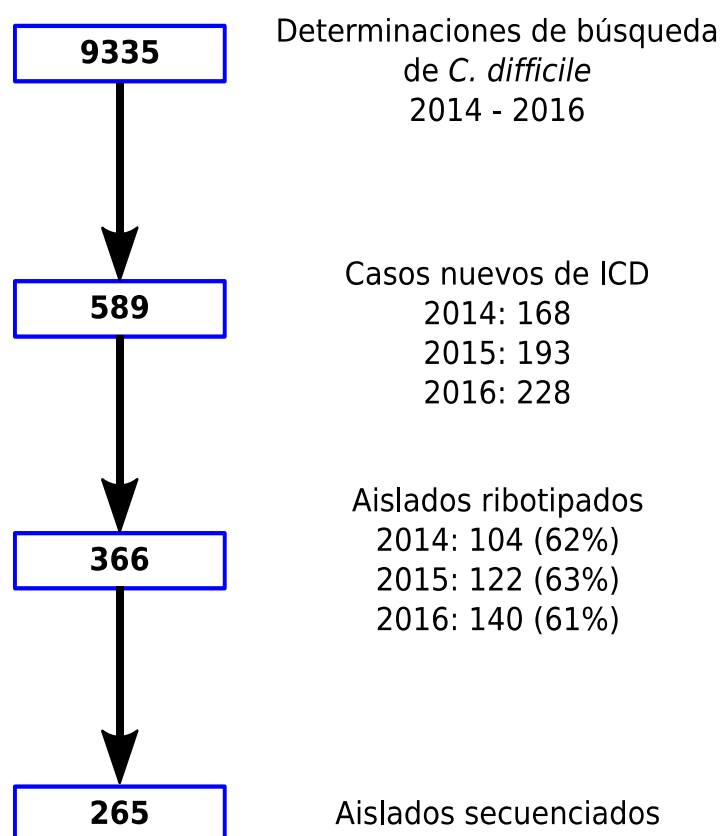
### Ribotipo 027

Como resultado de la vigilancia implementada en el hospital, se pudo describir en septiembre de 2014 el primer caso de ICD debido al ribotipo hiperepidémico 027. Además, se observó una importante tendencia al aumento del número de casos de 027, desde el primer aislamiento, hasta el año 2017, coincidiendo con un descenso del ribotipo 001. Cabe destacar que en 70 cepas de *C. difficile* obtenidas y tipificadas durante los años 2009 a 2012, no se encontró ningún caso de 027 (datos no incluidos en el presente trabajo), por lo que podemos afirmar que este ribotipo hipervirulento no se introdujo hasta 2014. En total se han documentado 32 casos causados por el ribotipo 027. La mayoría han sido clasificados como de adquisición hospitalaria (84,4%), un caso de adquisición comunitaria (paciente extranjera en tratamiento con anti tuberculostáticos por contacto con un familiar con tuberculosis) y 4 casos de origen indeterminado, aunque todos ellos tenían antecedentes de estancia en el hospital en los 3 meses previos de la ICD. Medicina Interna fue el Servicio donde se produjo el mayor número de casos de 027 (25,0%), seguido del de Enfermedades Infecciosas y el de Neumología (ambos 9,4%).

## RESULTADOS

### CAPÍTULO 2: Utilidad de la secuenciación de genoma completo para el estudio de la diversidad genética y de las rutas de transmisión de *C. difficile*

De un total de 9.335 determinaciones de diagnóstico de *C. difficile* durante el periodo 2014-2016, se identificaron 589 nuevos casos de ICD (6,3%). En 366 (62,3%) aislados de *C. difficile* de casos no duplicados, se realizó la caracterización molecular (**resultados en capítulo 1**), y finalmente, se secuenció el genoma de 265 aislados pertenecientes a los ribotipos con una representación de al menos 2 aislados, con el fin de estudiar su relación filogenética así como las frecuencias y rutas de transmisión de los distintos ribotipos (**Figura 21**).



**Figura 21.** Diagrama de estudio empleado en el análisis de las rutas y frecuencias de transmisión de *C. difficile*.

## RESULTADOS

### 3.1 Relación filogenética entre los aislados.

La SGC, como era de esperar, demostró tener un poder de discriminación mayor que la ribotipificación, ya que agrupó correctamente los aislados de un mismo ribotipo en base a la relación filogenética en un árbol de máxima verosimilitud (**Figura 22**), y además permitió establecer la relación filogenética entre los aislados pertenecientes a cada ribotipo (**Figuras 23-28**).

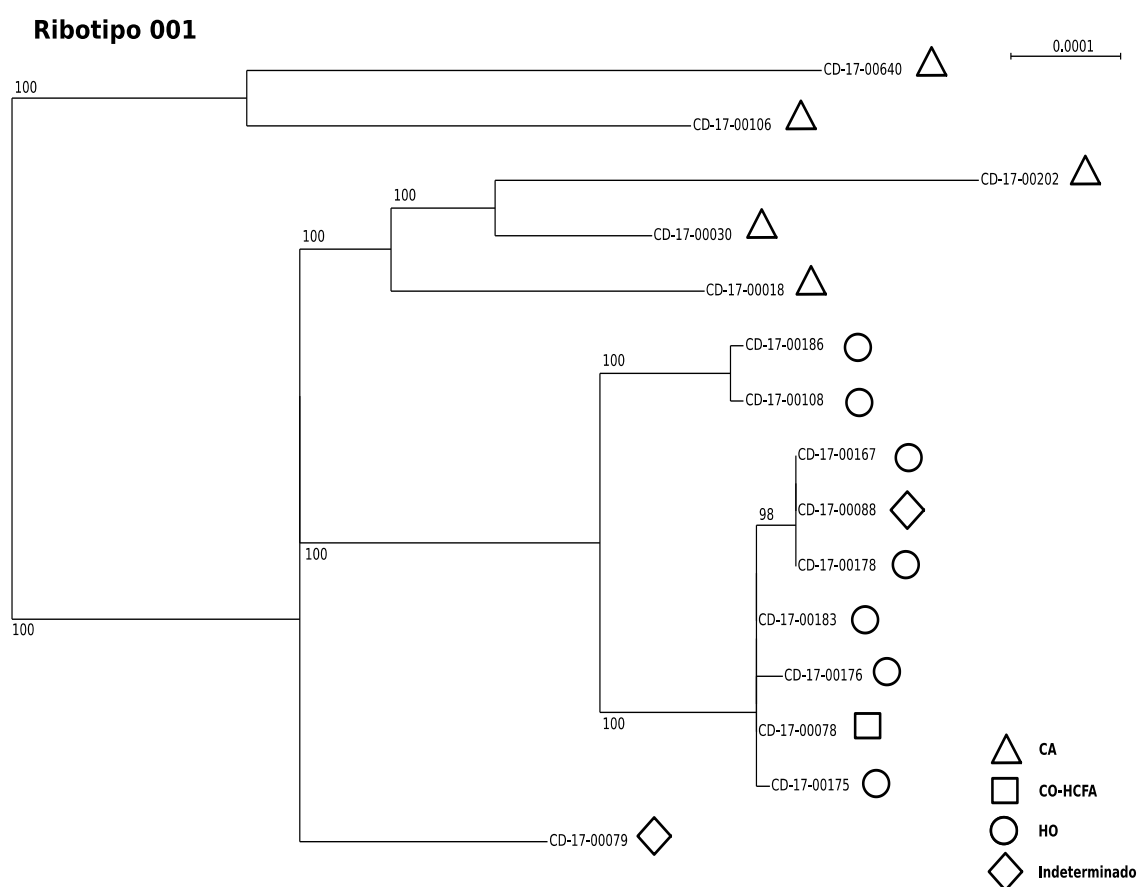


**Figura 22.** Árbol de máxima verosimilitud en el que se muestran todas las cepas secuenciadas. Las cepas aparecen coloreadas en base al ribotipo obtenido mediante la PCR y posterior electroforesis capilar realizada previamente.

## RESULTADOS

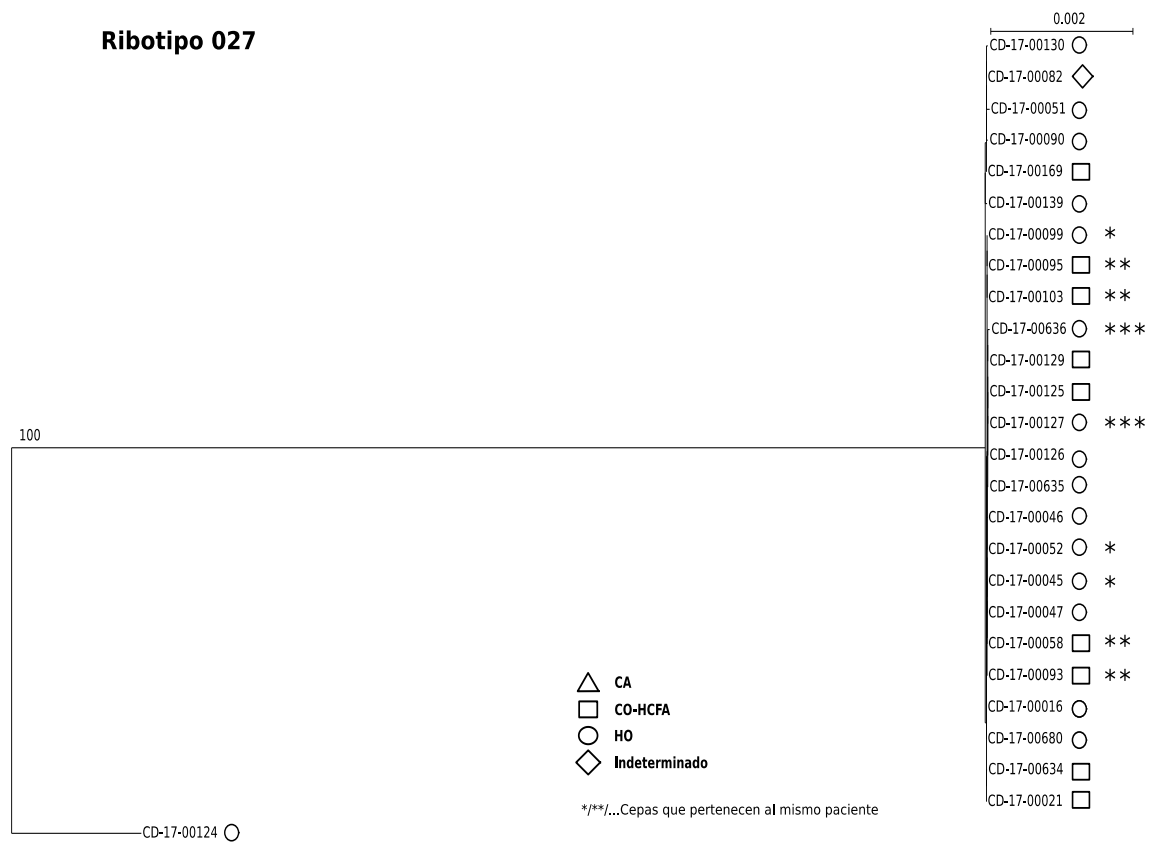
Para los aislados del ribotipo 001, las cepas adquiridas en la comunidad se alejaron en el árbol filogenético respecto a las adquiridas en el hospital (**Figura 23**), indicando mayor clonalidad entre los casos hospitalarios y mayor diversidad de orígenes en los comunitarios. Por el contrario, ambos orígenes se mezclaron en los ribotipos 078 y 014/020. En cualquier caso, no se evidenció ningún clúster hospitalario (**Figura 25 y 27**).

Se comprobó que el único aislado de ribotipo AI-33 (CD-17-00124), está estrechamente relacionado con el ribotipo 027 (**Figura 24**). También produce toxina binaria y presenta un electroferograma muy parecido al 027.



**Figura 23. Ribotipo 001.** Relación filogenética entre las cepas pertenecientes al ribotipo 001 construido mediante PhyML. Los símbolos indican el lugar de adquisición de cada cepa. Los valores de *bootstrap* >90% se indican en el árbol. Las cepas marcadas con el mismo número de asteriscos pertenecen al mismo paciente. Las cepas igualmente coloreadas pertenecen al mismo subtipo, basado en WEBRIBO.

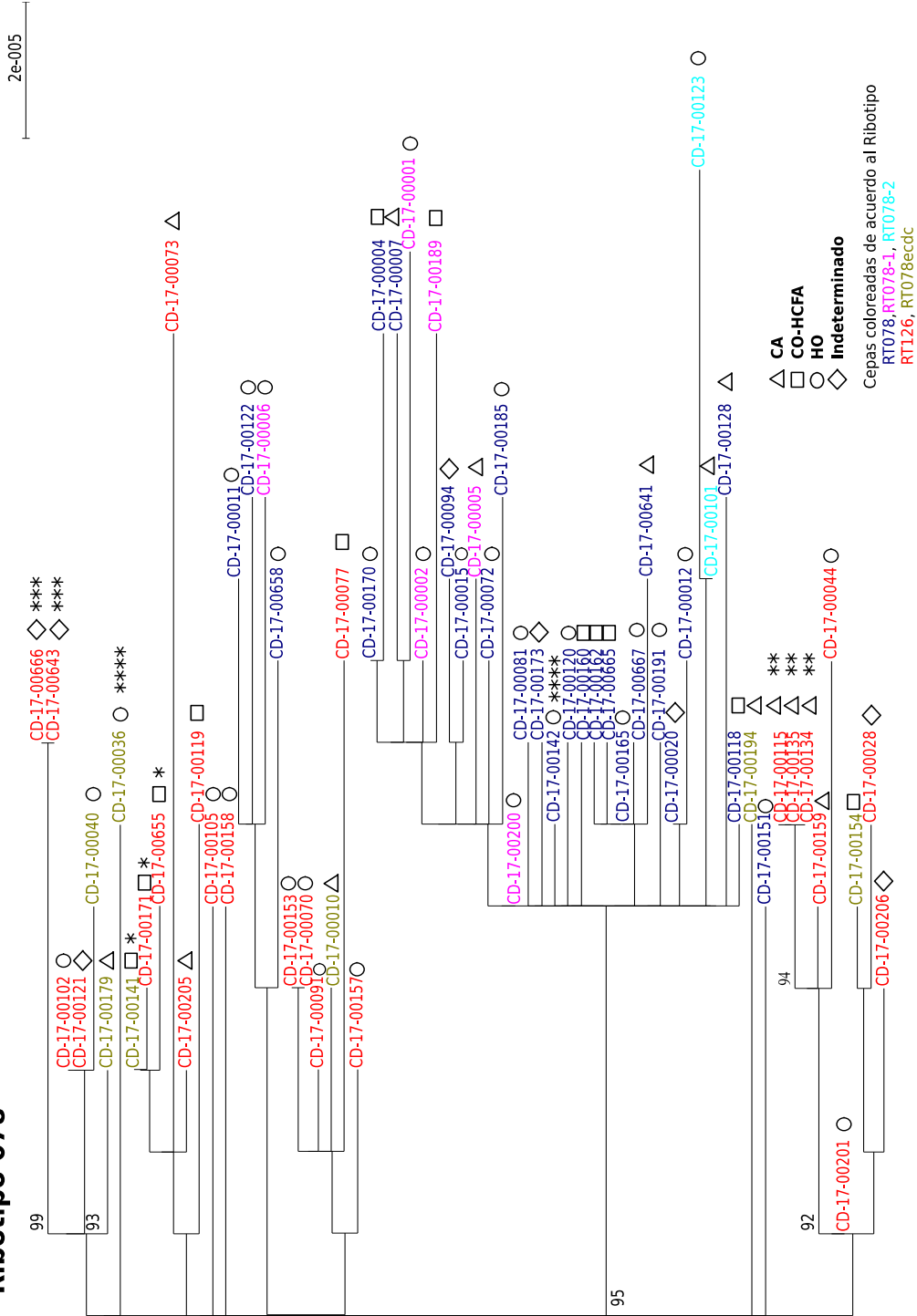
## RESULTADOS



**Figura 24. Ribotipo 027.** Relación filogenética entre las cepas pertenecientes al ribotipo 027 y AI-33 (CD-17-00124). Símbolos y *bootstrap* como la Figura 23.

RESULTADOS

Ribotipo 078



\*/#\*/...Cepas que pertenecen al mismo paciente

Figura 25. Ribotipo 078. Relación filogenética entre las cepas pertenecientes al ribotipo 078/126. Símbolos y *bootstrap* como la Figura 2

RESULTADOS

Ribotipo 106

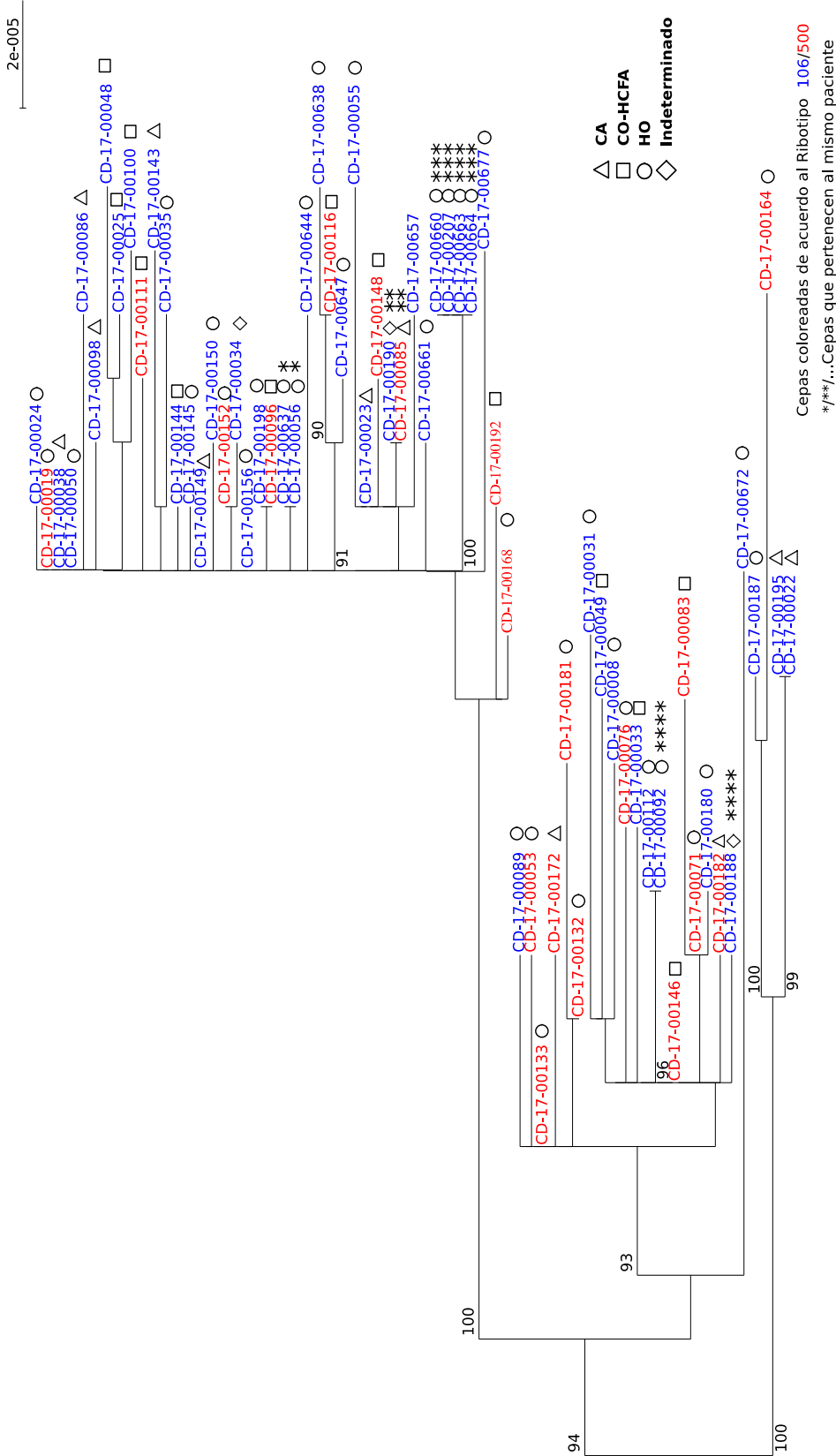
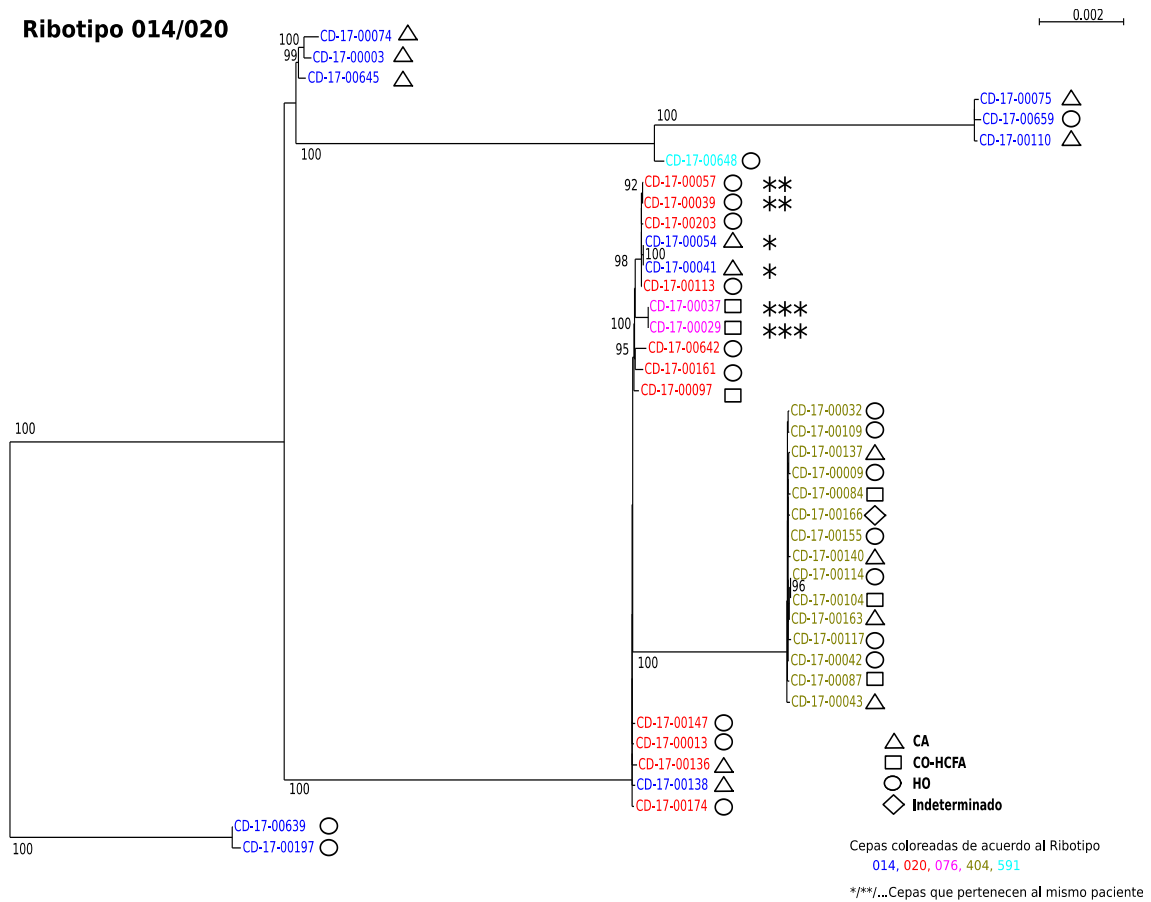


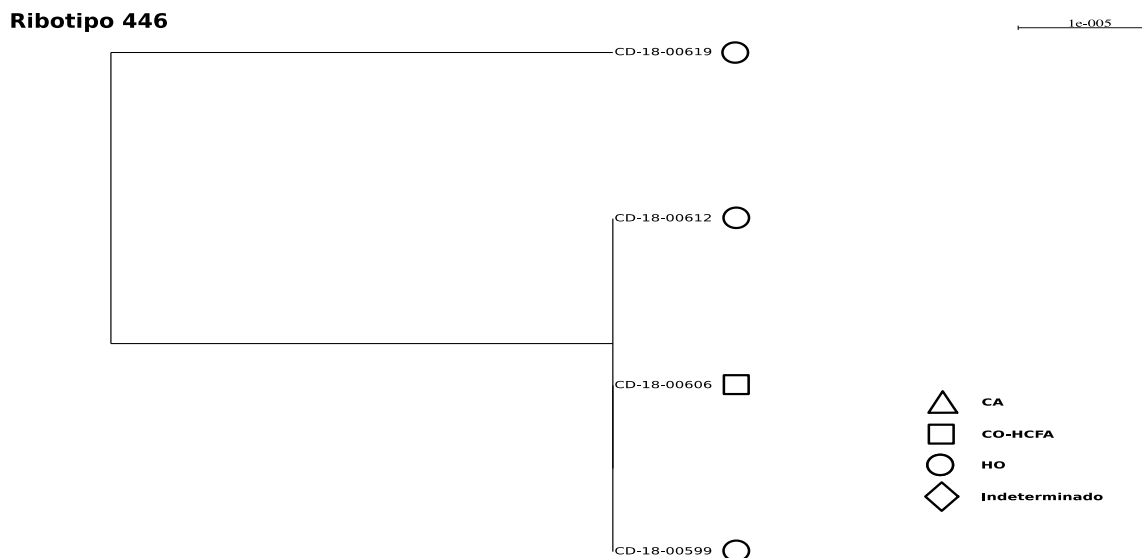
Figura 26. Ribotipo 106. Relación filogenética entre las cepas pertenecientes al ribotipo 106. Símbolos y *bootstrap* como la Figura 23.



## RESULTADOS



**Figura 27. Ribotipo 014/020.** Relación filogenética entre las cepas pertenecientes al ribotipo 014/020. Símbolos y *bootstrap* como la Figura 23.



**Figura 28. Ribotipo 446.** Relación filogenética entre las cepas pertenecientes al ribotipo 446. Símbolos y *bootstrap* como la Figura 23.

La construcción de árboles filogenéticos de máxima verosimilitud por ribotipos indicó que los diferentes subtipos generalmente no quedan representados en grupos filogenéticamente coherentes. Como ejemplo, encontramos los aislados pertenecientes al ribotipo 078, en el cual, debido a pequeñas diferencias en las bandas obtenidas en el electroferograma, WEBRIBO identifica distintos subtipos (078, 078ecdc, 078/1, 078/2, 126). Sin embargo, los aislados pertenecientes a idénticos subtipos no quedan agrupados conjuntamente, sino que están distribuidos de manera dispersa a lo largo del árbol filogenético del ribotipo 078 (**Figura 25**). Los aislados pertenecientes al ribotipo 106 y al 500 presentan un patrón de bandas muy parecido en el electroferograma, con una única banda de diferencia, pero el análisis filogenético permitió identificar que no se distribuyen en clados filogenéticos diferentes, por lo que todos los aislados pertenecerían al ribotipo 106 (**Figura 26**). Los ribotipos 076, 404 y 591 se agruparon en el clado del ribotipo 014/020 (**Figura 22 y 27**), y nuevamente, en el electroferograma se identificaron diferencias sutiles en los ribotipos 014/020 obtenidos con WEBRIBO.

En base a los resultados obtenidos en el estudio de la relación filogenética basada en la SGC, se simplificó la denominación de los ribotipos mayoritarios a lo largo de todo el desarrollo de esta tesis. De este modo nos referiremos al ribotipo 078 (agrupando los subtipos 078, 078ecdc, 078/1, 078/2 y 126), ribotipo 106 (106 y 500) y ribotipo 014/020 (014, 020, 076, 404 y 591).

### 3.2 Frecuencias de transmisión.

Durante el periodo de estudio considerado para el cálculo de las posibles transmisiones entre los casos de ICD (abril de 2014 y diciembre de 2016), se encontraron 41 (11,0%) aislados estrechamente relacionados (diferencia  $\leq 2$  SNPs entre los genomas) con otros aislados obtenidos en el hospital en un tiempo inferior a 90 días. En estos casos, donde existe un nexo genómico y epidemiológico, la transmisión directa se puede considerar como probable (**Tabla 10**).

## RESULTADOS

**Tabla 10.** Proporción de aislados relacionados con un caso previo ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días) entre los ribotipos mayoritarios (abril 2014-diciembre 2016).

Ribotipo	<sup>a</sup> aislados secuenciados	<sup>b</sup> probables transmisiones
001	15	5 (33,3%)
014/020	36	1 (2,8%)
027	20	12 (60,0%)
078	59	7 (11,9%)
106	59	14 (23,8%)
446	4	2 (50,0%)
<sup>c</sup> Otros	72	0 (0%)
<sup>d</sup> Total	366	41 (11,2%)

<sup>a</sup> Solo un aislado por caso de ICD

<sup>b</sup> Número de genomas relacionados con un caso previo ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días)

<sup>c</sup> Incluye 102 ribotipos representados por un único aislado y los siguientes ribotipos con múltiples aislados (número de aislados): 003 (7), 005 (7), 010 (2), 017 (3), 023 (3), 026 (2), 029 (2), 042 (2), 049 (2), 056 (4), 070 (4), 087 (4), 209 (5), 412 (2), 434 (2), 449 (5), 551 (2), 591 (3), 592 (4), 610 (3), AI-78 (2), AI-83 (2)

<sup>d</sup> Cálculo total incluyendo los 265 aislados secuenciados y los 101 aislados pertenecientes a los ribotipos con representación de un único caso

La proporción de aislados relacionados ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días) fue variable, encontrándose una frecuencia de transmisión próxima al 3% en el ribotipo 014/020, mientras que en el ribotipo 027 fue del 60% (**Tabla 10**). Las mayores frecuencias de transmisión se correspondieron con los ribotipos más habituales del entorno hospitalario (001, 027 y 106), con respecto a los comunitarios (014/020, 078).

Entre los 41 probables eventos de transmisión identificados, 7 casos clasificados como de adquisición comunitaria (8% de los 83 casos CA caracterizados durante el periodo de estudio) estuvieron relacionados genética y temporalmente ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días) con aislados obtenidos previamente en el hospital. De estos 7 pacientes, en al menos 4 de ellos se encontraron registros en sus historias clínicas de diferentes visitas al hospital sin ingreso hospitalario lo que podría justificar la fuente de adquisición (**Tabla 11**).

## RESULTADOS

Por otro lado, 34 (12%) de los 284 aislados caracterizados e identificados como de adquisición hospitalaria estaban relacionados con otros aislados previos, lo que indica que la mayor probabilidad de transmisión ocurriría en el medio hospitalario.

**Tabla 11.** Casos comunitarios relacionados con un caso previo  $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días

Paciente	Secuencia	Adquisición	Comentarios
<sup>a</sup> 078_A	CD-17-00205	CA	Sin ingreso hospitalario
106_E	CD-17-00149	CA	Múltiples visitas al hospital, sin ingreso hospitalario
106_K	CD-17-00182	CA	Sin ingreso hospitalario en las 12 semanas previas a la ICD (julio 2014). Ingresos en 2013
106_L	CD-17-00085/ CD-17-00190	CA	Sin ingreso hospitalario
106_O	CD-17-00023	CA	Múltiples visitas al hospital, sin ingreso hospitalario
106_R	CD-17-00038	CA	Múltiples visitas al hospital, sin ingreso hospitalario
106_W	CD-17-00098	CA	Sin ingreso hospitalario

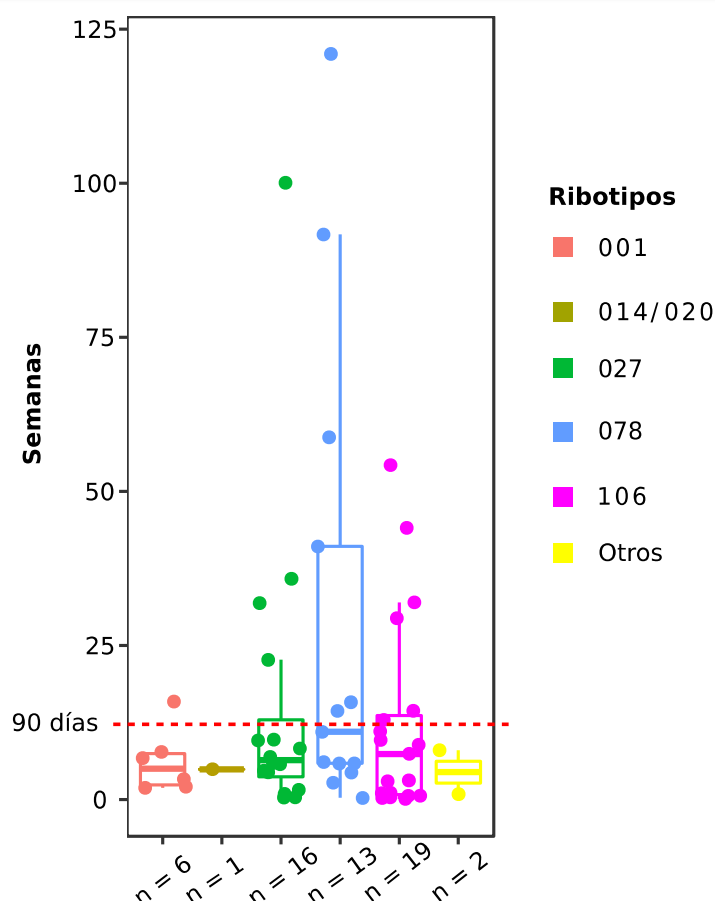
<sup>a</sup> Pacientes nombrados de acuerdo a las figuras 33 y 34

### 3.3 Rutas de transmisión.

Para trazar las rutas de transmisión de cada ribotipo se emplearon todos los aislados relacionados genéticamente ( $\leq 2$  SNPs) con un aislado previo, sin tener en cuenta el criterio temporal  $\leq 90$  días. De este modo, a los 41 probables eventos de transmisión se sumaron 21 casos de ICD estrechamente relacionados con otros casos previos, pero con intervalos de tiempo superiores a los 90 días.

El intervalo de tiempo transcurrido entre dos casos genéticamente relacionados fue  $\leq 90$  días en el 70% de los probables eventos de transmisión encontrados, mientras que en el 30%, el intervalo de tiempo fue mayor a 90 días. Es interesante destacar que el intervalo de tiempo transcurrido entre 6 aislados genéticamente relacionados fue mayor a un año (**Figura 29**).

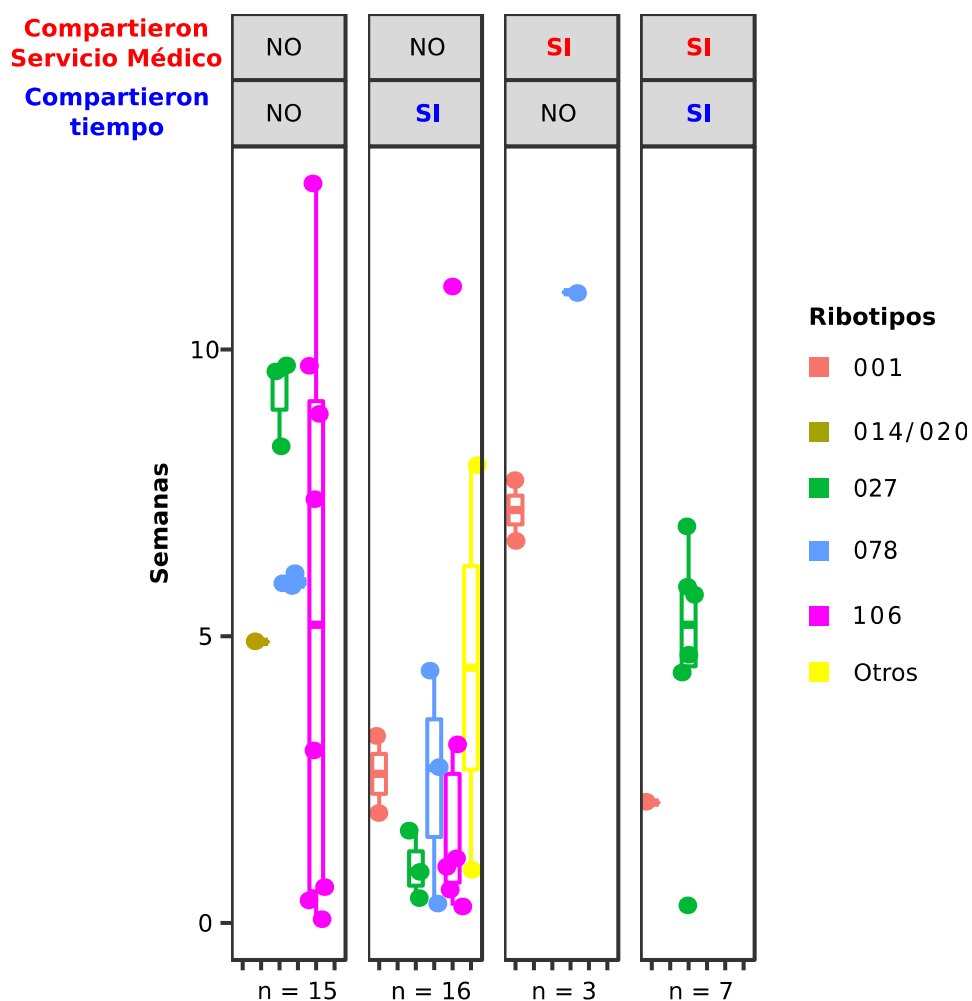
## RESULTADOS



**Figura 29.** Intervalos de tiempo transcurridos entre el aislamiento de dos cepas pertenecientes a cada posible evento de transmisión. Cada punto representa un par de cepas de *C. difficile* estrechamente relacionadas (diferencia  $\leq 2$  SNPs del genoma *core*). Los colores indican los ribotipos. Las líneas horizontales indican los valores de tiempo medios, las cajas indican el primer y tercer cuartil, respectivamente, y las líneas verticales indican los valores máximos y mínimos. Las cepas están estrechamente relacionadas, pero en el 30% de los eventos de transmisión han pasado más de 90 días.

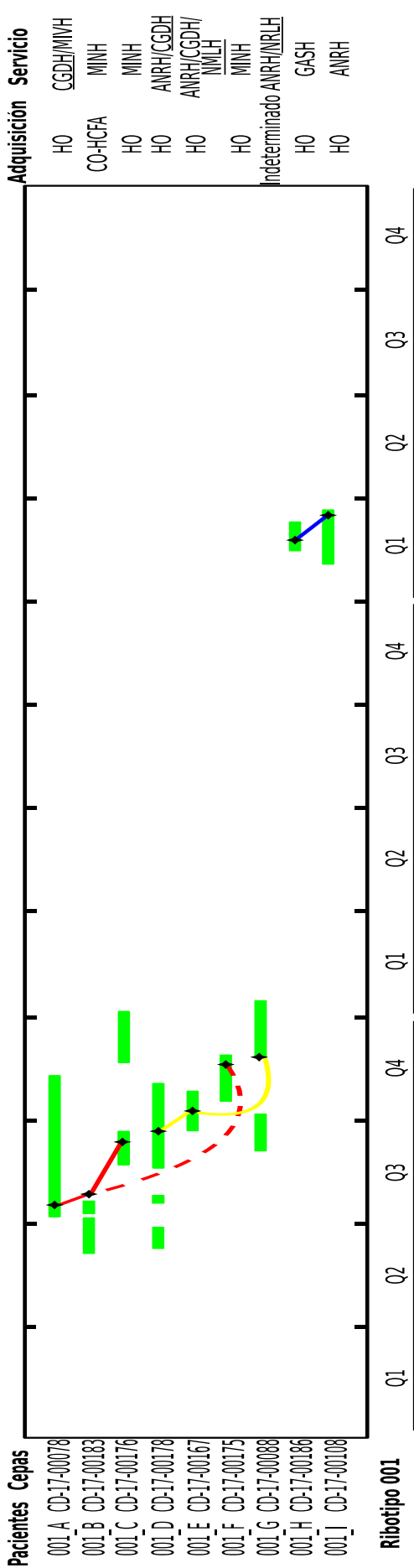
Entre los 41 eventos de transmisión ocurridos entre casos relacionados genética y temporalmente ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días), solamente 10 parejas de pacientes (24%) habían estado ingresadas en el mismo Servicio Médico y tan solo 7 (17%) habían coincidido en el mismo Servicio al mismo tiempo. Mientras que en 18 (44%) eventos de transmisión, los pacientes no habían coincidido temporalmente con sus presuntas fuentes de transmisión, y en 16 (39%), los pacientes habían coincidido temporalmente pero en distintos espacios físicos, lo que sugiere que la transmisión fue común, sin existir contacto directo entre pacientes sintomáticos (**Figura 30**).

## RESULTADOS



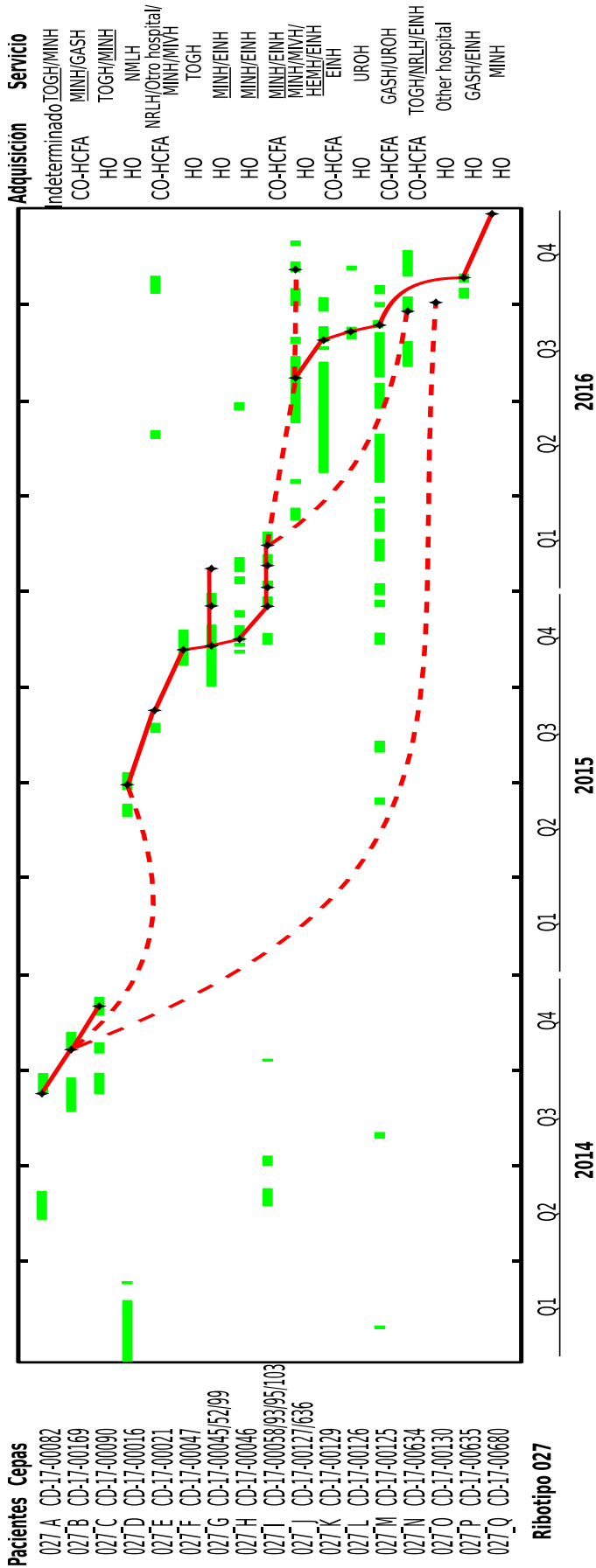
**Figura 30.** Los eventos de transmisión aparecen estratificados considerando si los pacientes habían compartido tiempo y/o Servicio Médico y solo se muestran las cepas relacionados genética y temporalmente ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  días).

Las rutas de transmisión de los 62 posibles eventos detectados se muestran clasificados por ribotipos en las **figuras 31 a 36**. Se representan todos los aislados genéticamente relacionados ( $\leq 2$  SNPs) y el menor intervalo de tiempo posible entre las fechas de aislamiento de las cepas de *C. difficile*.



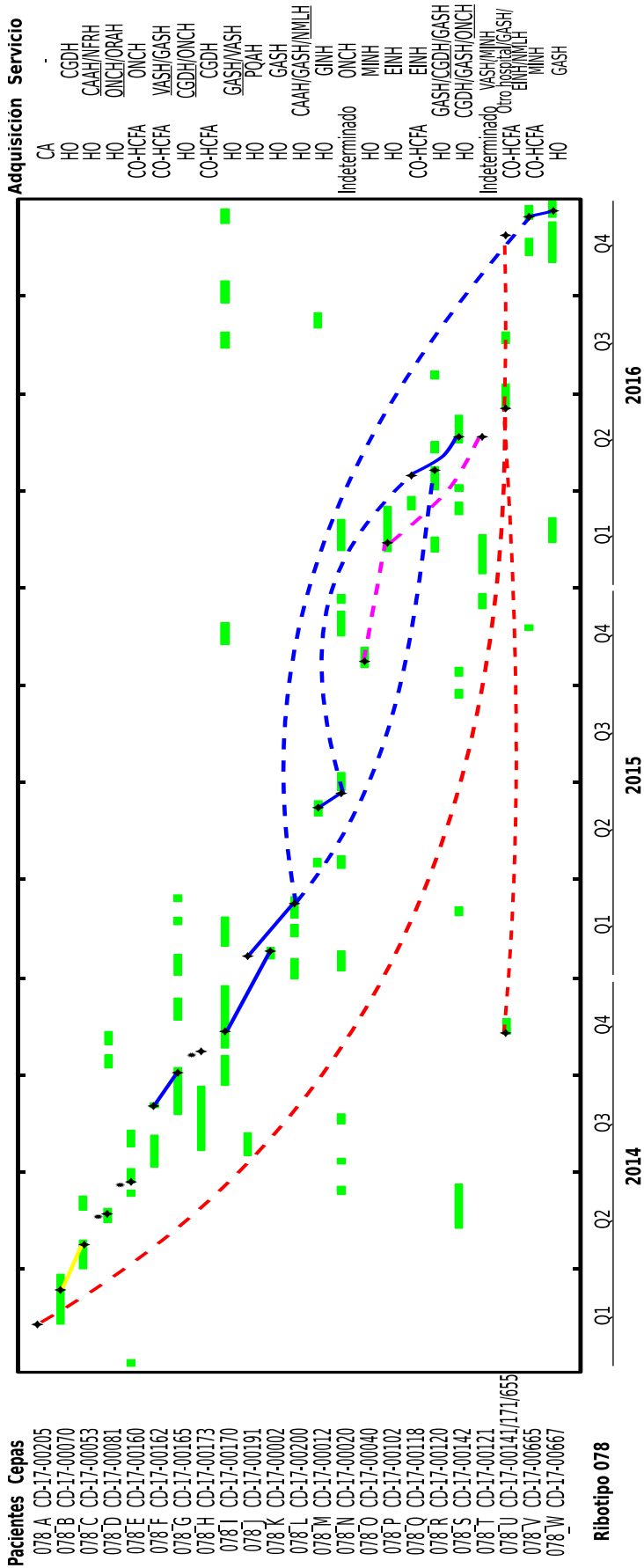
**Figura 31. Ribotipo 001.** Posibles eventos de transmisión que conectan pacientes con *C. difficile* ribotipo 001. La figura muestra 3 clústeres que involucran a 4 (rojo), 3 (amarillo) y 2 (azul) pacientes, respectivamente. Las barras verdes indican los tiempos de hospitalización de los pacientes y los rombos negros las fechas de diagnóstico de la ICD. Las líneas que conectan a los pacientes, indican cepas genéticamente relacionadas ( $\leq 2$  SNPs), siendo continuas si el intervalo de tiempo es  $< 90$  días y discontinuas si es  $> 90$  días. Los asteriscos indican pacientes con cepas genéticamente relacionadas ( $\leq 2$  SNPs), pero no vinculadas a un caso anterior. Los pacientes 001\_B y 001\_F habían ocupado la misma cama (con 97 días de diferencia). Los acrónimos de los servicios médicos son: Anestesia y Reanimación (ANRH); Angiología y Cirugía Vascular (VASH); Cardiología (CAAH); Gastroenterología (GASH); Cirugía General (CGDH); Ginecología (GINH); Hematología (HEMH); Enfermedades Infecciosas (EINH); Medicina Intensiva (MIVH); Medicina Interna (MINH); Nefrología (NFRH); Neurología (NRLH); Oncología (ONCH); Otorrinolaringología (ORAH); Neumología (NMLH); Cirugía Plástica (CPLH); Psiquiatría (PQAH); Traumatología (TRAH/TOGH); Urología (UROH). En el caso de que un paciente hubiera estado en diferentes servicios, el subrayado indica dónde se encontraba el paciente en el momento del diagnóstico de la ICD.

RESULTADOS



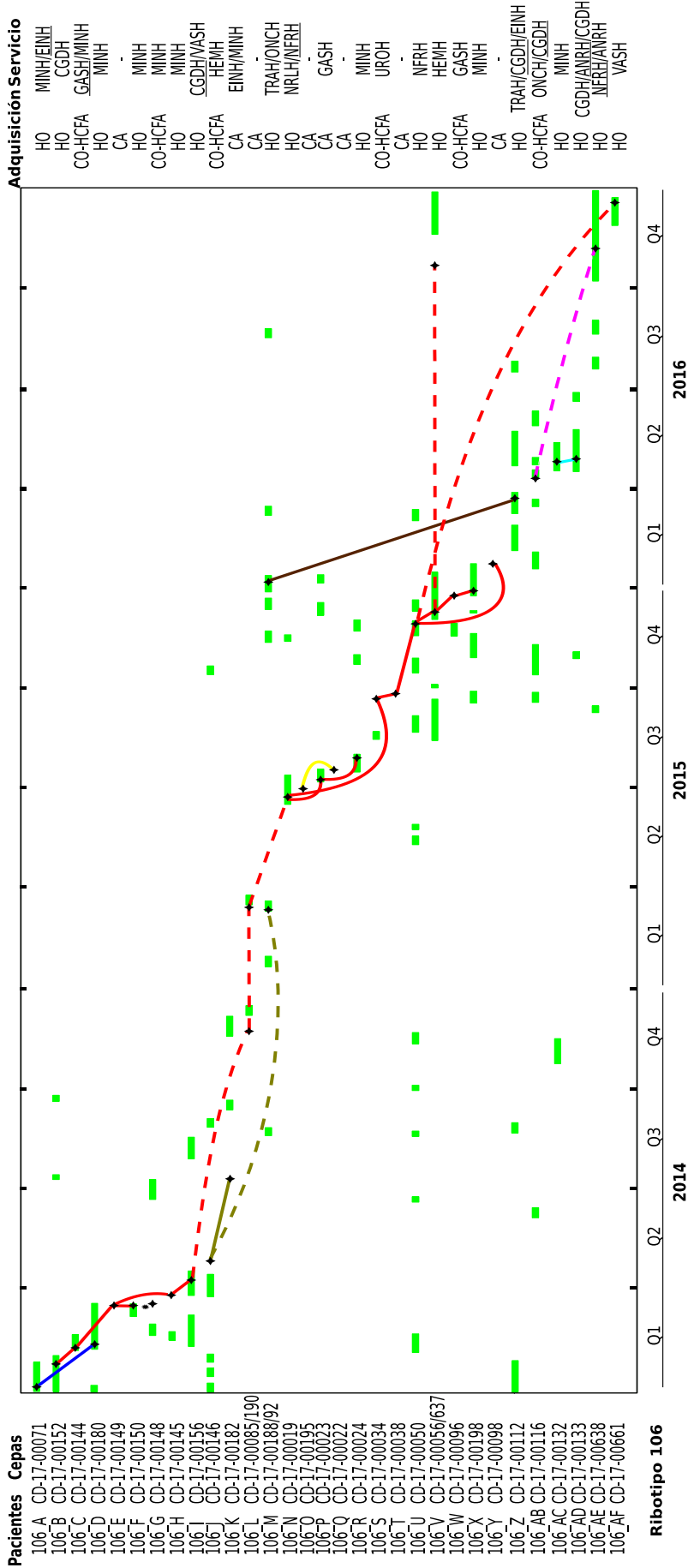
**Figura 32. Ribotipo 027.** Posibles eventos de transmisión que conectan pacientes con *C. difficile* ribotipo 027. Símbolos y líneas como la Figura 31. La figura muestra un clúster que involucra a 17 pacientes. Los pacientes 027\_G y 027\_H ocuparon la misma cama (con 0 días de diferencia) y también los pacientes 027\_G y 027\_J (con 100 días de diferencia).



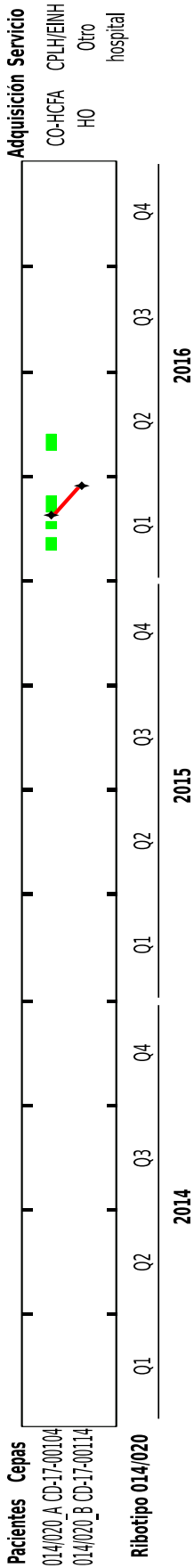


**Figura 33. Ribotipo 078.** Posibles eventos de transmisión que conectan pacientes con *C. difficile* ribotipo 078. Símbolos y líneas como la Figura 31. La figura muestra 4 clústeres que involucran a 13 (azul), 3 (rojo), 3 (morado) y 2 (amarillo) pacientes. Los pacientes 078\_I y 078\_K ocuparon la misma cama (con 50 días de diferencia).

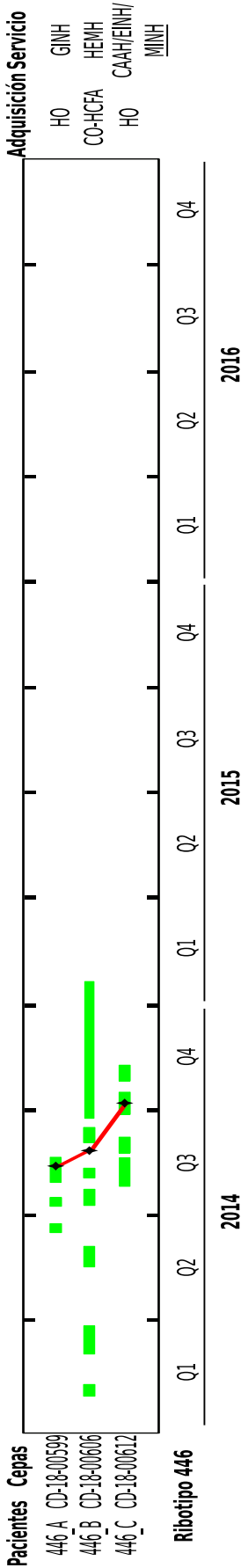
RESULTADOS



**Figura 34. Ribotipo 106.** Posibles eventos de transmisión que conectan pacientes con *C. difficile* ribotipo 106. Símbolos y líneas como la Figura 31. La figura muestra 7 clústeres que involucran a 18 (rojo), 3 (oliva), 2 (azul), 2 (azul celeste), 2 (marrón), 2 (rosa) y 2 (amarillo) pacientes.



**Figura 35. Ribotipo 014/020.** Posibles eventos de transmisión que conectan pacientes con *C. difficile* ribotipo 014/020. Símbolos y líneas como la Figura 31. La figura muestra 1 clúster que involucran a 2 pacientes.



**Figura 36. Ribotipo 446.** Posibles eventos de transmisión que conectan pacientes con *C. difficile* ribotipo 446. Símbolos y líneas como la Figura 31. La figura muestra 1 clúster que involucran a 3 pacientes.

## RESULTADOS

Globalmente, se detectaron 17 probables clústeres de transmisión (entre 2 y 18 personas cada uno de ellos) que afectaron a 85 pacientes en total, (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Probables clústeres de transmisión detectados mediante SGC.

Ribotipo	<sup>a</sup> Clústeres	<sup>b</sup> Pacientes, n°
001	1 (rojo)	4
	2 (amarillo)	3
	3 (azul)	2
014/020	1 (rojo)	2
027	1 (rojo)	17
078	1 (azul)	13
	2 (rojo)	3
	3 (morado)	3
	4 (amarillo)	2
106	1 (rojo)	18
	2 (oliva)	3
	3 (azul)	2
	4 (azul celeste)	2
	5 (marrón)	2
	6 (rosa)	2
	7 (amarillo)	2
446	1 (rojo)	3

<sup>a</sup> Color de acuerdo a las figuras 31–36

<sup>b</sup> Número de pacientes implicados

Algunos ribotipos que no se detectaron durante largos periodos de tiempo (meses e incluso años), volvieron a aparecer causando casos de ICD genéticamente relacionados ( $\leq 2$  SNPs) (**Figuras 31 a 34**).

Es interesante señalar que 4 pacientes estuvieron exactamente en la misma habitación y cama que los pacientes con los que comparten la misma cepa de *C. difficile*, con una distancia temporal de entre 0 y 100 días, lo que señala al ambiente como posible reservorio de transmisión de *C. difficile* (**Tabla 13 y Figuras 31 a 33**).

## RESULTADOS

**Tabla 13.** Pacientes con cepas de *C. difficile* genéticamente relacionadas ( $\leq 2$  SNPs) que estuvieron en la misma cama durante sus respectivos ingresos.

Ribotipo	<sup>a</sup> Pacientes	<sup>b</sup> Diferencia temporal
001	001_B y 001_F	97 días
027	027_G y 027_I	0 días
	027_G y 027_J	100 días
078	078_I y 078_K	50 días
<sup>a</sup> Pacientes nombrados de acuerdo a las figuras 31 a 33		
<sup>b</sup> Tiempo transcurrido entre el alta de un paciente y el ingreso del siguiente		

La dinámica de transmisión fue ligeramente mayor en los Servicios de Medicina Interna y de Gastroenterología, donde se produjeron el 29% y 17% de los eventos de transmisión, respectivamente. Concretamente, en Medicina Interna se contabilizaron 14 casos de ICD genéticamente relacionados con un caso previo, mientras que en Gastroenterología se registraron 8 casos (**Figuras 31 a 36**). Además, de los 10 posibles eventos de transmisión que ocurrieron entre pacientes que compartieron el mismo Servicio Médico, 5 tuvieron lugar en Medicina Interna y 2 en Gastroenterología.

### 3.4 SGC en aislados obtenidos en episodios de ICD recurrente

En 15 pacientes que presentaron dos o más episodios de ICD (independientemente de si fueron considerados como casos nuevos o casos de ICDr) con distintas semanas de diferencia entre sí, se incluyó un aislado de *C. difficile* de cada episodio de infección para realizar la SGC (**Figura 37**).

En 13 de los casos, todas las cepas obtenidas estuvieron genéticamente relacionadas ( $\leq 2$  SNPs), lo que demuestra que estos pacientes presentaron episodios de recidiva (misma cepa), en vez de episodios de reinfección con una cepa diferente.

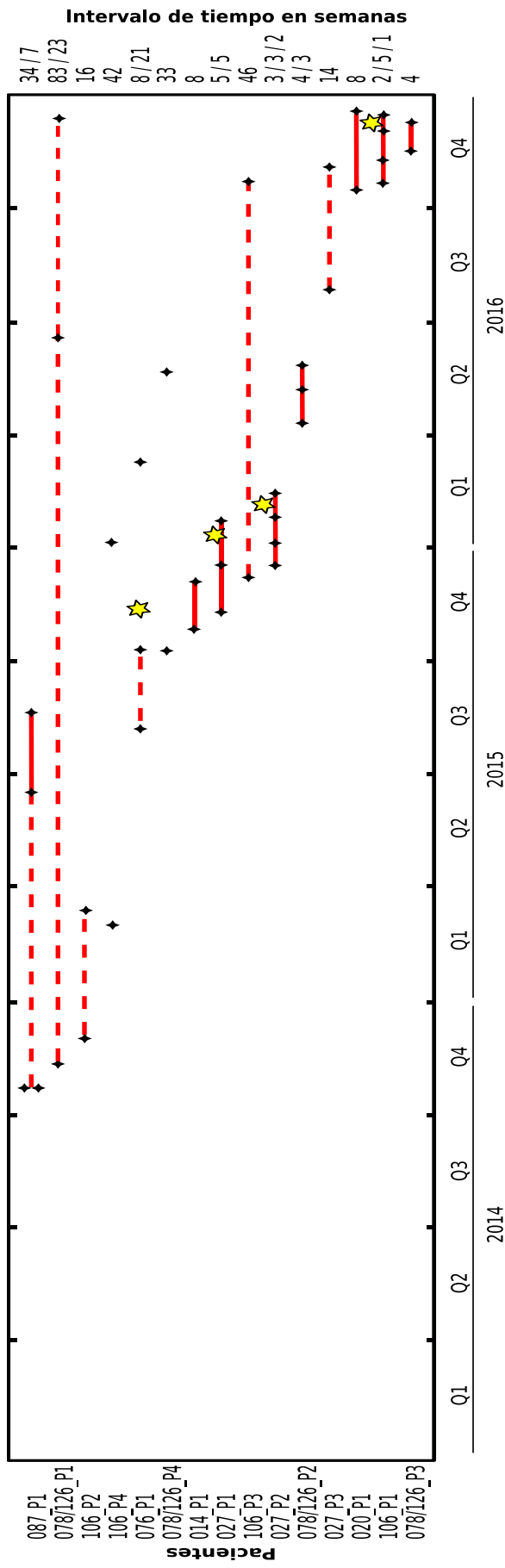
Cabe destacar que en 6 (46%) de las recidivas identificadas por SGC, transcurrió un intervalo de tiempo mayor de 8 semanas desde el primer episodio de ICD, con un rango entre 8,1 a 23 semanas. Este resultado excede al punto de corte empleado actualmente en los sistemas de vigilancia (8 semanas) para definir un episodio de ICDr.

Se estudiaron 4 aislados de *C. difficile* obtenidos de pacientes que habían sido tratados mediante TMF. En 3 de ellos, la cepa recuperada tras el TMF estaba genéticamente relacionada ( $\leq 2$  SNPs) con la de los episodios de ICD previos al TMF. Este resultado avalaría un posible estado de colonización persistente de los pacientes

## RESULTADOS

---

sometidos a TMF, a pesar de haber sido este un tratamiento efectivo que suprime la diarrea.



**Figura 37.** Líneas de tiempo que muestran a pacientes con 2 o más cepas de *C. difficile* secuenciadas. Los rombos negros indican las fechas de diagnóstico de la ICD y sucesivos episodios de recurrencia. Las estrellas amarillas indican las fechas de la realización del TMF. Las líneas conectan cepas genéticamente relacionadas ( $\leq 2$  SNPs), indicando las líneas solidas intervalos de tiempo  $\leq 8$  semanas y las líneas discontinuas intervalos  $> 8$  semanas.

### 3.5.- Estudio molecular de un brote de ICD causado por el ribotipo 018

Entre julio y principios de agosto de 2013, se produjo una acumulación de casos de ICD en el Servicio de Gastroenterología, identificándose 13 casos que potencialmente podían constituir un brote, por lo que se tomaron medidas preventivas de control de infección. Además, los casos confirmados se agruparon en el mismo control de enfermería por lo que se bloqueó la entrada de nuevos ingresos. A mediados de agosto y ante la ausencia de nuevos casos sospechosos, se reabrió la unidad. Previamente se realizó una limpieza y desinfección en profundidad de las habitaciones, controles de enfermería y zonas comunes.

El estudio molecular retrospectivo de las cepas confirmó al ribotipo 018 como el causante de un brote que afectó al menos a 6 de esos 13 pacientes (**Figura 38**), mientras que otros 4 pacientes tenían cepas de los ribotipos 078 ( $n=2$ ), 001 ( $n=1$ ) y 014/020 ( $n=1$ ), y finalmente, en 3 casos no se pudo recuperar la cepa causante de la diarrea para realizar el estudio molecular.

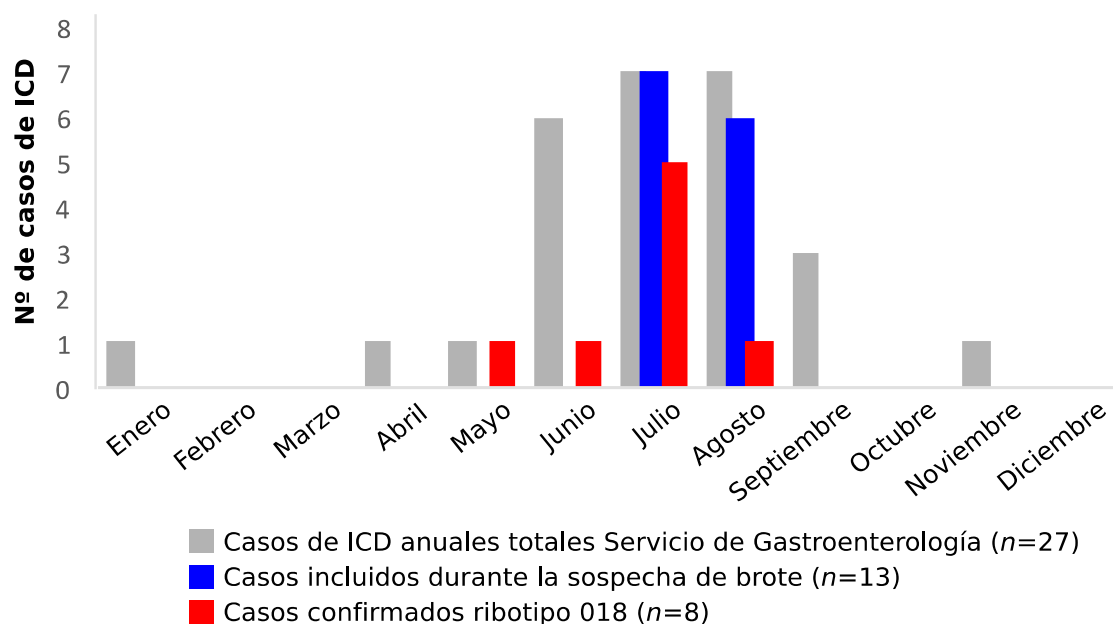
La caracterización del resto de cepas disponibles del año 2013 permitió identificar otros 6 pacientes infectados por el ribotipo 018, cuya inclusión no se había sospechado por no compartir el mismo nexo temporal y/o espacial (4 previos al brote, 1 durante y otro posterior). Por tanto, aumentó a 12 la cifra de los afectados confirmados por el brote del ribotipo 018. La adquisición de *C. difficile* fue en todos los casos hospitalaria (HO, 7 casos y CO-HCFA, 5 casos), y el caso índice (previamente situado el 11 de julio) se situó el 7 de mayo. La revisión de la estancia hospitalaria de los pacientes no identificados durante la situación original de brote, reveló que no se circunscribió exclusivamente a Gastroenterología. Hubo 4 casos de 018 en Medicina Interna (3 casos) y Cirugía Digestiva (1 caso) (**Figura 39**).

Se realizó la SGC en aislados de 8 pacientes, confirmándose la relación genómica entre los casos ( $\leq 2$  SNPs), y además se incluyeron las cepas de 2 pacientes que presentaron episodios de ICDr por ribotipo 018, demostrándose que fueron episodios de recaídas ( $\leq 2$  SNPs). Adicionalmente, se secuenció la única cepa de ribotipo 018 encontrada entre los años 2014-2016 pero esta cepa no tuvo ninguna relación con el anterior brote ( $>10$  SNPs) (**Figura 40**).

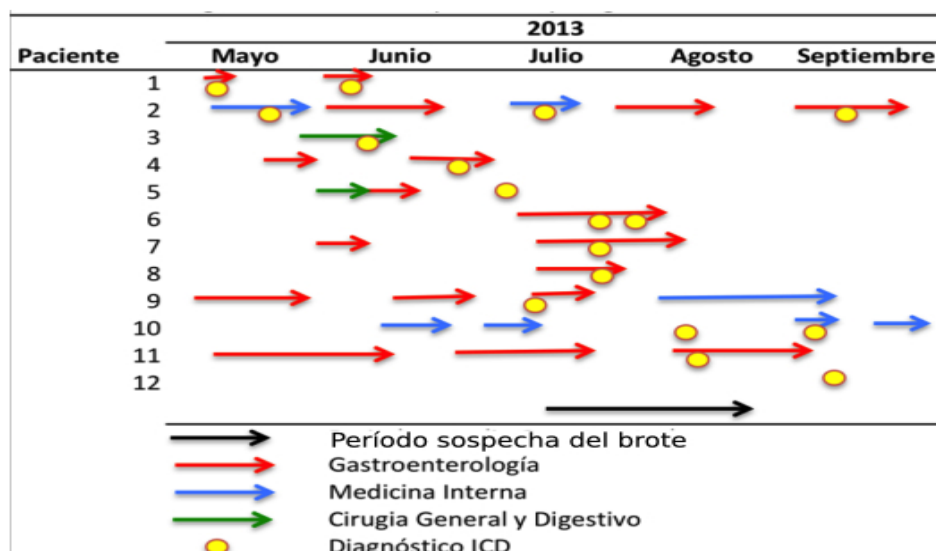
El brote fue controlado de manera satisfactoria a partir de las medidas de precaución por contacto establecidas y al cierre y limpieza en profundidad de la unidad. No se volvió a detectar ningún otro caso de ribotipo 018 en todo el hospital hasta casi 3 años después.



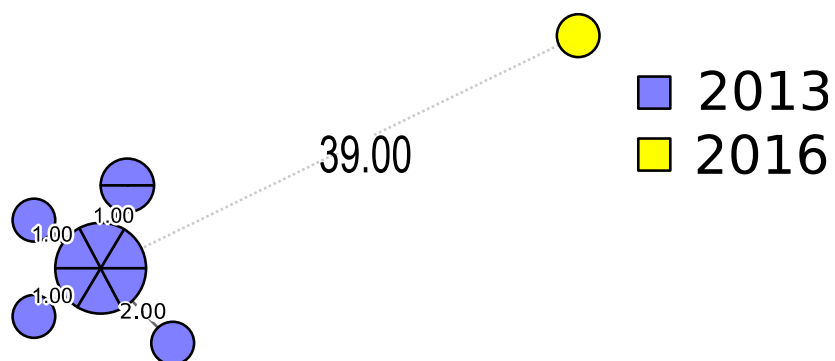
## RESULTADOS



**Figura 38.** Casos de ICD en el Servicio de Gastroenterología durante 2013. En gris, los casos totales (n=27). En azul, los casos sospechosos de pertenecer al brote, respecto de los totales (n=13). En rojo, los casos pertenecientes al brote confirmados genotípicamente (n=8). No se incluyen 4 casos de 018 identificados en otros Servicios Médicos. El periodo de sospecha de brote se produjo entre julio y mediados de agosto.



**Figura 39.** Estancia hospitalaria de los 12 casos confirmados de 018. Gastroenterología (n=8), Medicina Interna (n=3) y Cirugía Digestiva (n=1).



**Figura 40.** Relación genómica ( $\leq 2$  SNPs) entre los casos de ribotipo 018 identificados en 2013. La cepa correspondiente al año 2016 no guarda relación con los casos previos.

### CAPÍTULO 3: Transferencia de microbiota fecal para el tratamiento de la ICD recurrente

#### 3.1- Constitución de un equipo multidisciplinario

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se instauró en nuestro país, en el primer trimestre de 2015, el primer programa de TMF para el tratamiento de la ICDr y sigue vigente en la actualidad. El programa se lleva a cabo por parte de un equipo multidisciplinario integrado por profesionales del Servicio de Enfermedades Infecciosas, del Servicio de Gastroenterología y Hepatología y del Servicio de Microbiología y Parasitología. Las funciones de cada Servicio se resumen a continuación:

El **Servicio de Enfermedades Infecciosas** es el encargado del seguimiento de los pacientes con ICD y de establecer la indicación de TMF en pacientes con ICD con múltiples recurrencias. Inicialmente acceden al mismo los pacientes con al menos dos episodios de ICDr y que han fracasado con el tratamiento de fidaxomicina y/o con el anticuerpo monoclonal bezlotoxumab. Además, es el encargado de seleccionar a los posibles donantes entre los familiares, de informar a los pacientes de los riesgos y beneficios de la intervención, así como del seguimiento del paciente tras la realización del TMF.

Desde el **Servicio de Gastroenterología y Hepatología** se encarga de la selección de los potenciales donantes y de realizar las colonoscopias. La selección de los donantes es un punto crucial y para ello se realiza una anamnesis general, una exploración física y un cuestionario específicamente diseñado. Posteriormente, se realiza un cribado exhaustivo de patógenos transmisibles en heces y sangre, incluyendo bacterias multirresistentes a los antibióticos.

El **Servicio de Microbiología y Parasitología** realiza el diagnóstico de la ICD, así como el estudio microbiológico en muestras de sangre y suero requeridos en la selección de los donantes. Además, es el responsable del procesamiento de las muestras de heces del donante para su entrega a la Unidad de Endoscopias en el momento de la realización del TMF.

### 3.2- Procesamiento de heces para la TMF

Se utilizan una o varias deposiciones recientes del donante que se recogen en contenedores estériles específicos que preservan la anaerobiosis (*Gut Alive*, Microviable Therapeutics). Un factor limitante para la TMF es la cantidad de muestra, ya que se requiere una cantidad de entre 50-100 gramos de heces. Es muy recomendable guardar una segunda muestra congelada, tanto por motivos médico-legales como por la posibilidad de que sea necesario repetir la intervención.

El procesamiento de las heces se debe realizar de acuerdo a un *Nivel 2 de Bioseguridad*, con equipo de protección individual (guantes impermeables, gafas de bioseguridad, mascarilla, calzado cerrado, bata) y se debe trabajar en cabina de seguridad biológica para control de aerosoles. Entre 50 y 100 gramos de heces se diluyen en 500 mililitros de agua estéril, se dejan hidratar durante 15-20 min y se homogeneizan con agitación suave (vórtex) hasta alcanzar una consistencia semilíquida. Posteriormente, se filtra o bien se centrifuga para eliminar los productos no digeridos que puedan obstruir el colonoscopio. El sobrenadante de la solución obtenida se distribuye en tubos de 250 mililitros y se inyecta mediante colonoscopia en el ciego del paciente. Es muy importante la coordinación con la Unidad de Endoscopias para entregarle la preparación de la muestra en el menor tiempo posible.

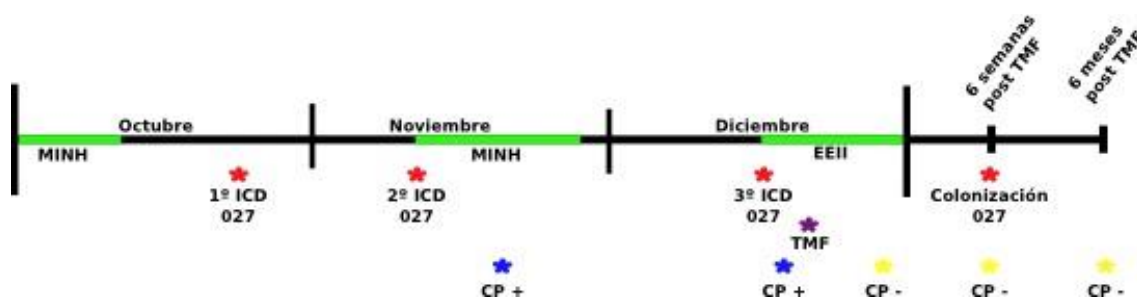
### 3.3- Descripción de resultados

Desde que se instauró el programa de TMF, a principios de 2015 y hasta el final de 2018, se ha realizado TMF a 29 pacientes. Doce pacientes no pertenecían a nuestra área y fueron trasladados desde otros centros. La media y mediana de edad de los pacientes fue 78,4 años y 83,5 años, respectivamente (rango: 42-98), correspondiendo el 62% al sexo femenino y habiendo presentado una mediana de 3 episodios de ICD previos a la realización del TMF (rango: 2-7). Durante el seguimiento hasta las 8 semanas post TMF, el 82,8% de los sujetos (24 casos) no presentaron recurrencias, y en el seguimiento hasta los 6 meses, no presentaron nuevos episodios de ICD el 75,9% (22 casos). Hubo un paciente con un nuevo episodio de ICD a los 11 meses del TMF. No se registraron efectos adversos secundarios al tratamiento endoscópico.

### 3.4- Erradicación de *Klebsiella oxytoca* productora de metalo-carbapenemasa VIM-1 tras la realización de TMF para el tratamiento de ICDr

Dentro del programa de TMF, describimos el caso de una paciente de 84 años, pluripatológica, que ingresó en nuestro hospital el 1 de octubre de 2015 debido a un proceso de neumonía y que fue tratada durante 10 días con moxifloxacino por vía oral (400 mg/24 h). El 22 de octubre, acudió al Servicio de Urgencias con abundantes deposiciones, siendo diagnosticada de ICD mediante la detección directa de toxinas libres en heces. Recibió un tratamiento inicial de 4 días con metronidazol (500 mg vía oral cada 8 horas por 2 días, seguido de 500 mg vía intravenosa cada 8 horas otros dos días) seguido de vancomicina vía oral 2 semanas (500 mg/6 h).

El 11 de noviembre fue ingresada nuevamente en el hospital con diarrea y diagnóstico de un primer episodio de ICDr. En este segundo episodio se trató con fidaxomicina (200 mg/12 h) y fue dada de alta el 27 de noviembre. Durante este segundo ingreso y dentro de los controles de colonización por microorganismos multirresistentes a los antibióticos, se aisló en la paciente una cepa de *K. oxytoca* productora de carbapenemasa VIM-1 a partir de una muestra remitida en torunda rectal. El 18 de diciembre la paciente volvió a ser ingresada con un segundo episodio de ICDr, y nuevamente se detectó en este ingreso la colonización por *K. oxytoca* productora de VIM-1. Inicialmente se trató con vancomicina y se puso en marcha el protocolo de TMF que se realizó el 22 de diciembre, siendo el donante su hijo de 45 años. La paciente fue dada de alta el 30 de diciembre, con ausencia de sintomatología de la ICD, negativizándose asimismo el último control de portador rectal para la detección de microorganismos multirresistentes. La descolonización fue nuevamente comprobada a las 6 semanas y a los 6 meses mediante medios cromogénicos y de amplificación de ácidos nucleicos, siendo en todos los casos negativos. Posteriormente se analizaron las cepas de *C. difficile* aisladas en los 3 episodios de ICD, así como en una muestra posterior al TMF, y se pudo identificar al ribotipo hipervirulento 027 como el causante de los procesos de infección y recurrencias, confirmando que el ribotipo no había sido completamente erradicado tras el TMF, aunque no causara ninguna patología (**Figura 41**).



**Figura 41.** Cronología del caso de erradicación *Klebsiella oxytoca* productora de metalo-carbapenemasa VIM-1. Las líneas verdes representan los ingresos de la paciente en el hospital. Los puntos rojos, indican el momento de diagnóstico de cada episodio de ICD o colonización, todos producidos por el ribotipo 027. El punto morado indica la fecha del TMF. Los puntos azules representan los cultivos de control de portadores positivos para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Los puntos amarillos representan los cultivos negativos de control de portadores.

## DISCUSIÓN

---





La incidencia media de ICD en Europa ha aumentado desde 2,5 casos por 10.000 pacientes-día en 2005 hasta 7,0 casos por 10.000 pacientes-día en 2013 (246). Este aumento ha sido atribuido en gran parte a la emergencia de los ribotipos hiperepidémicos 027 y el 078, pero también es consecuencia de las mejoras en el diagnóstico tras la introducción de técnicas moleculares en la rutina. Otra posible causa es la mayor concienciación global sobre esta enfermedad, lo que conduce a una mayor sospecha clínica y a incremento del número de peticiones para búsqueda de *C. difficile*.

En nuestro Servicio, el número de peticiones de *C. difficile* aumentó gradualmente desde 1.733 en 2009, hasta 3.750 en 2018, lo que supone un incremento del 116,4%. También han aumentado las determinaciones de toxinas con resultado positivo a partir de 2012, coincidiendo con la incorporación de las técnicas de inmunoensayo para la detección de GDH y de toxina. Estas técnicas mejoraron la capacidad de diagnóstico y además gracias a su sencillez se incorporaron a las guardias del Servicio de Microbiología, lo que también ha contribuido al aumento de las peticiones de *C. difficile*.

Del mismo modo, se incrementó el número de resultados positivos a partir del año 2014 coincidiendo con la implementación de la técnica de amplificación de ácidos nucleicos y del empleo de los algoritmos de 2-3 pasos recomendados por las guías ESCMID (61), si bien el porcentaje de resultados positivos de toxinas se ha mantenido en una media constante, en torno al 8,0%.

A modo de resumen podemos decir que en los últimos años hemos pasado de una situación de marcado infradiagnóstico, en la que hasta el 66,0% de los casos podrían no estar diagnosticados (285), a una situación actual de sobrediagnóstico ya que la elevada sensibilidad de los de las TAAN (313) detectan los genes que codifican las toxinas pero podría no haber expresión de los mismos y no existir producción *in vivo* de las mismas.

Como en otras áreas de la Microbiología Clínica, el diagnóstico de la ICD evoluciona y continuamente aparecen nuevos abordajes que aportan alguna ventaja. Recientemente se ha evaluado un inmunoensayo basado en la detección de toxinas mediante fluorescencia (314), en el se aboga por reducir el algoritmo diagnóstico a un único paso. También se postula el empleo del umbral de amplificación de los genes que codifican las toxinas como marcadores de gravedad (195). Y se han publicado trabajos en los que se muestran claras diferencias clínicas, por ejemplo de gravedad o recurrencias, en pacientes diagnosticados por toxina directa, respecto a los diagnosticados por TAAN (toxina directa negativa) (197, 315). En cualquier caso, e

independientemente del método diagnóstico empleado, siempre debe prevalecer la valoración clínica del paciente por parte de un experto en Enfermedades Infecciosas que decida la instauración o no del tratamiento.

### **Incidencia y lugar de adquisición**

Durante el periodo de estudio en nuestro hospital hemos constatado una incidencia media de 4,2 casos por 10.000 pacientes-día (contando solo los casos HO), y contabilizando conjuntamente los casos hospitalarios, HO y CO-HCFA, la incidencia sería de 5,5 por 10.000 pacientes-día. De ambas formas, estas cifras están por debajo de la media Europea que se situó en 7,0 en 2013 (246).

Nuestro trabajo ha evidenciado un aumento de la incidencia de ICD en nuestro hospital, desde los 3,9 casos por 10.000 pacientes-día en 2013 a 4,6 en 2018, destacando sobre todo el aumento de los casos comunitarios, desde los 6,6 a los 13,4 casos por 100.000 habitantes. Es importante destacar que durante los años de estudio se han empleado diferentes técnicas de diagnóstico, lo que limita parcialmente las comparaciones. Aunque no fue objetivo de esta Tesis evaluar las causas del aumento de la incidencia de ICD podemos decir que en nuestra experiencia, la introducción de sistemas basados en TAAN ha contribuido a un aumento del diagnóstico, como ya se ha evidenciado en otros trabajos (316).

Varios trabajos han destacado el aumento de casos de ICD en el entorno comunitario, afectando en general a población joven, sin factores de riesgo habituales (14). En el último año de estudio (2018), hasta el 30,0% de los casos de ICD diagnosticados en nuestro hospital fueron comunitarios, en concordancia con otros estudios donde la proporción se encuentra entre el 25% y 40% (110, 317).

También se ha reflejado el aumento de casos clasificados como indeterminados, desde 2,9% en 2013 al 10,2% en 2018, y para este fenómeno es complicado encontrar una explicación. Debido a la definición, pueden incluirse casos de adquisición hospitalaria en los que el paciente se coloniza pero en los que las manifestaciones clínicas de la ICD aparecen más tarde de lo habitual, o también pueden ser casos de adquisición comunitaria.

La edad media de nuestros pacientes fue de 69,4 años, similar a la descrita previamente por otros autores (14). En nuestra serie los pacientes con adquisición hospitalaria tenían más edad que los casos comunitarios, 71,6 y 63,7 años, respectivamente. La mediana de días transcurridos desde el ingreso al momento del

diagnóstico de la ICD en los casos HO, fue de 9 días, en línea con un trabajo nacional de casos-contróles, en el que fue de 10 días (156), y los días de estancia totales fueron mayores en los casos HO respecto de los CO-HCFA (19 y 12 días, respectivamente).

Los casos de adquisición hospitalaria se detectaron en varios Servicios Médicos aunque se concentraron en Medicina Interna (23%), Gastroenterología (12%) y Cirugía General (10%), ya que estos son servicios en los que por norma general, los pacientes cumplen con mayor probabilidad los factores de riesgo habituales de padecer ICD, y donde además hay gran consumo de antibióticos. Medicina Interna es el Servicio que posee más camas del hospital y ocupa varias zonas dentro del hospital distantes, aunque parte del personal puede ser compartido.

### Recurrencias

La definición de ICDr que se ha empleado en esta Tesis es la que aparece en las guías Europea y Americana (63, 146), así como en el documento técnico del ECDC (318), que establece los datos mínimos recomendables para la vigilancia de las infecciones de *C. difficile*. En la definición se establece que la recurrencia puede acontecer desde la segunda semana (coincidiendo con la finalización del tratamiento) hasta la octava semana del episodio previo, y se considera como nuevo caso al episodio que ocurre tras más de 8 semanas de un episodio anterior.

Un 16,5% de nuestros pacientes padecieron episodios de ICDr, en línea con lo descrito previamente, entre 15% y 35% (319–321). Sin embargo, nuevamente, nuestro estudio no está ajustado por edades o factores de riesgo, por lo que son valores orientativos y no representan grupos concretos. La menor proporción de episodios de ICDr ocurrió en 2013 (11,6%), lo que puede guardar relación con la baja capacidad diagnóstica por no disponer de técnicas moleculares.

La mayoría de las ICDr ocurrieron en la tercera y cuarta semana tras el episodio inicial de infección, con una mediana de 27 días, coincidiendo con lo descrito previamente, en cuanto a que el riesgo de recurrencia es mayor en los primeros 14 días tras el tratamiento (189, 322).

En 48 casos tuvimos la oportunidad de estudiar el ribotipo en cepas provenientes de distintos episodios de infección de un mismo paciente, pudiendo determinar que la mayoría de los casos eran recurrencias (77,1%) causadas por el mismo ribotipo, mientras que el 22,9% fueron clasificados como reinfecciones por ribotipos diferentes. La ribotipificación no es suficientemente discriminadora por lo que en algunos casos a

pesar de encontrar el mismo ribotipo, en realidad podrían ser linajes genéticos diferentes. Los trabajos publicados hasta la fecha, en general coinciden en que la mayoría de los episodios de ICDr se deben a recaídas más que a reinfecciones. En el análisis de las cepas causantes de recurrencias durante los ensayos de fase 3 de fidaxomicina, se comprobó que el 83,3% se debía a la misma cepa (174). En la cohorte de un hospital suizo en el que también estudiaron pares de cepas de mismos pacientes con ICDr, en el 76,6% coincidía el mismo ribotipo (176); y en otro estudio español el porcentaje de recidivas respecto del total de episodios de ICDr fue del 69,3% (323). Por lo tanto, se puede inferir que, en general, la mayoría de las recurrencias se deben a recidivas causadas por el mismo ribotipo.

Se ha publicado la coexistencia de varios linajes de *C. difficile* en un mismo episodio de infección (178). Este hecho no es valorable en nuestro trabajo puesto que en el análisis molecular siempre se partió desde una única colonia. Entre las recaídas/reinfecciones, no encontramos diferencias en el tiempo transcurrido entre los dos episodios de infección (medianas de 29 y 26 días, respectivamente); sin embargo el número de casos considerados en nuestro trabajo es pequeño; en otros trabajos si se ha descrito que el margen entre episodios tiende a ser mayor en las reinfecciones (324, 325).

La SGC identificó que el 46% de las recidivas (mismo genoma,  $\leq 2$  SNPs) se produjeron en periodos superiores a 8 semanas del primer episodio de ICD y estos resultados concuerdan con trabajos preliminares que evidencian importantes discrepancias a la hora de definir el punto de corte de un episodio de ICDr. En el estudio de Kamboj *et al.*, el 88% de las ICDr que ocurrieron en un tiempo inferior a 8 semanas fueron recaídas con la misma cepa, pero también lo fueron el 65% de las ICDr que ocurrieron pasadas las 8 semanas (326). En un trabajo similar, el 76,6% y el 45,8% de las ICDr fueron recaídas en tiempos menores y mayores de 8 semanas, respectivamente (176). En otro trabajo basado en SGC se encontró un rango de ICDr entre 4 y 26 semanas, con una media de 12 semanas entre los episodios (179). En base a estos resultados, hay autores que han propuesto aumentar el punto de corte por encima de 8 semanas para establecer si un episodio es recurrencia, ya que tiene consecuencias en los cálculos de incidencia de ICD, así como en los análisis de efectividad de los tratamientos (176). Sin embargo, aunque estos resultados apoyan un cambio en la definición actual de recurrencia, el número de casos incluidos en estos trabajos es limitado (15 en nuestro estudio). Los pacientes podrían permanecer colonizados tras el

tratamiento y sufrir recurrencias tardías; tampoco se puede descartar por completo, en estos casos, las reinfecciones con cepas idénticas, ya que el entorno alrededor de los pacientes con ICD puede estar contaminado con las esporas de *C. difficile* que pudieron producir el episodio inicial de ICD (172). Por ello, para poder establecer si el punto de corte de 8 semanas estuviera clasificando erróneamente los episodios de infección, sería necesario realizar un estudio más amplio y analizar, mediante SGC, pares de cepas del mismo paciente.

### **Epidemiología molecular**

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se implantó el estudio de la epidemiología molecular de la ICD mediante el método de ribotipificación y posterior electroforesis capilar. Actualmente es el método considerado de referencia, tanto en Europa como en EE.UU (129, 192). La información previa en nuestro país sobre la epidemiología molecular de este microorganismo ha sido escasa hasta los últimos años; a excepción de los trabajos realizados en otro hospital de la Comunidad de Madrid (285) y la participación de algunos hospitales en estudios multicéntricos europeos (83, 247). En los últimos años se han comunicado nuevos datos de otros hospitales, pero sin embargo, la mayoría de estos trabajos han sido realizados mediante ribotipificación por PCR, donde se compara el patrón de bandas de los aislados en estudio con ribotipos de referencia, generalmente los ribotipos 001, 014/020, 027 y 078/126. Es una técnica adecuada para identificar los ribotipos que por norma general son los mayoritarios, pero no permite identificar los ribotipos que no se encuentren entre los controles, ni los ribotipos estrechamente relacionados como el 014 y 020; el 078 y 066; o el 027 con el 176, entre otros. Tras la ribotipificación y la electroforesis se obtiene un electroferograma que en la base de datos *online* WEBRIBO permite la obtención de un amplio número de ribotipos de entre todos los depositados en la web (132, 136). El motivo por el que finalmente nos decidimos a implantar esta técnica es por su gran poder de discriminación y su facilidad de comparar los resultados entre los laboratorios.

Entre los años 2013 y 2018 hemos detectado una gran diversidad genética representada por 124 ribotipos, siendo la mayoría de ellos los que se encuentran de manera habitual en otros estudios europeos (83) de origen hospitalario (ribotipos 001, 027 y 106), y de los que se cree que tienen reservorios diferentes, posiblemente asociados con contaminación ambiental y con el contacto con animales (014/020, 078) (327).

Algunos ribotipos que son prevalentes/emergentes en otros países de Europa se encontraron muy poco representados en nuestra colección. El ribotipo 176, productor de toxina binaria y relacionado estrechamente con el 027, solamente se identificó en 3 casos, y sin embargo es un clon muy frecuente en Europa Central y del Este (328, 329). El ribotipo 002, habitual en Europa del Norte y en Francia, tan solo produjo el 1,0% de nuestros casos (247, 330). Tampoco es frecuente el ribotipo 018, a excepción del brote ocurrido en Gastroenterología, pero es el más frecuente en Italia (82). No se identificó ningún ribotipo 015 ni 140, ambos entre los 10 más comunes de Europa (247). El 017 es el ribotipo predominante en Aisa y Australia (268), sin embargo en nuestro trabajo se encontró esporádicamente.

La distribución de ribotipos dentro y fuera del hospital es muy similar, con la salvedad de una mayor diversidad en la comunidad; además se mantiene bastante estable durante todos los años de estudio. El ribotipo 027 se ha identificado de manera excepcional en un único caso de adquisición comunitaria en una paciente extranjera que acudió al Servicio de Urgencias del hospital durante su tratamiento con anti tuberculostáticos. Esta paciente provenía de Rumanía, un país con elevada endemicidad de cepas 027 (> 75%), (331-332); por lo que se podría sospechar que esta paciente estaba ya colonizada en su país de origen. Sin embargo, la presencia de este ribotipo hipervirulento/endémico en la comunidad si está descrita ampliamente en Europa y en EE.UU. (60, 80, 157, 333).

De igual manera, las distribuciones de los clones predominantes tampoco variaron entre los servicios médicos con más casos de *C. difficile*, salvo que no se encontró ningún 027 en Gastroenterología o Cirugía General. La mayor diversidad de ribotipos se encontró en los pacientes más jóvenes, hecho seguramente relacionado con la mayor frecuencia de casos comunitarios en este grupo.

### **Ribotipos mayoritarios**

#### **Ribotipo 027**

El ribotipo epidémico 027 se describió por primera vez en España en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid (287), documentándose un brote que afectó a 141 pacientes (250). En nuestro hospital no tenemos constancia de este ribotipo hasta que se realizó el presente estudio, identificándose por primera vez en septiembre de 2014 y desde ese momento ha aumentado su prevalencia desde 2,9% en 2014, hasta 7,3% en 2017, afectando a 32 pacientes en total. Curiosamente, la prevalencia del ribotipo 027

en 2018 descendió hasta el 1,7%. En otros países ya se ha descrito una menor frecuencia de ICD causada por este ribotipo, posiblemente debido a la instauración de programas PROA (Programas de Optimización de Uso de los Antibióticos) y por lo tanto, más a una reducción del uso fluoroquinolonas que a un mejor control de la infección (302). En España existen pocos trabajos epidemiológicos en los que se haya buscado activamente la presencia de ribotipos epidémicos, se ha notificado la presencia de 027 (290), pero seguramente esté presente en muchos más hospitales, donde no se ha identificado aún.

Sin embargo, no se puede descartar que en nuestro hospital existieran casos anteriores puesto que no se habían estudiado a nivel molecular todos los casos. Solo tenemos la certeza de que en las 92 cepas de 2013 y en las 70 cepas disponibles entre los años 2009 y 2012 (previo a este estudio) no se encontró ninguna del ribotipo 027. Tampoco se identificó ningún aislado de este ribotipo en el estudio multicéntrico de Alcalá *et al.*, en el que también participó nuestro hospital (285).

La SGC reveló que todos los casos de ICD producidos por cepas del ribotipo 027 estaban estrechamente relacionados y procedían de un ancestro común. También se demostró que al menos el 60% de los casos se produjeron por transmisión entre pacientes con ICD, conduciendo a una persistencia y dispersión continua en el hospital y causando un brote que pasó inadvertido, prolongándose durante todo el periodo de estudio y afectando al menos a 17 pacientes entre 2014 y 2016 (**Figura 24**). De manera similar, en un hospital en China se produjeron 2 brotes producidos por 027 y separados por un período superior a un año, siendo la misma cepa ( $\leq 2$  SNPs) la causante en ambos (105). Todos los datos apuntan al mantenimiento de *C. difficile* en distintas superficies, gracias a que la formación de esporas le permiten resistir la acción de los desinfectantes y las condiciones ambientales adversas.

### **Ribotipo 001**

El ribotipo 001 es uno de los mayoritarios en Europa (83) y en España también lo ha sido. En un estudio multicéntrico europeo en 2005, fue el ribotipo más prevalente en 3 hospitales de Madrid siendo responsable del 73% de todos los casos (334), y en el estudio multicéntrico español representó el 18% (285). En nuestro Hospital, entre 2009-2012, el 13% de los aislados se agruparon en el ribotipo 001, pero posteriormente la prevalencia ha ido en descenso, desde el 8,7% en 2014 hasta el 2,8% en 2018.

Es posible que el incremento de 027 haya causado el descenso concomitante de 001, puesto que ambos clones son resistentes a fluoroquinolonas y por ello pueden



ocupar los mismos nichos, como ya se ha observado anteriormente (335, 336). También han podido contribuir en este aspecto los ribotipos 106 y el 078, resistentes a las fluoroquinolonas y con una elevada prevalencia en nuestro entorno.

### **Ribotipo 106**

El ribotipo 106 tiene una menor distribución internacional que los ribotipos 027 o 001, sin embargo se ha descrito como uno de los mayoritarios en España (83). Recientemente, también se ha identificado como el ribotipo principal de otro hospital terciario de España (290). En nuestro entorno, este ribotipo ha sido responsable del 22,2% de los casos hospitalarios y del 18,1% de los comunitarios. La SGC ha permitido identificar un patrón de transmisión hospitalaria frecuente de este ribotipo, ya que una cuarta parte de las cepas analizadas estuvieron genética y epidemiológicamente relacionadas con un caso previo, produciendo un brote mantenido en el tiempo (al igual que el 027), que ha afectado al menos a 18 pacientes (**Figura 26**).

### **Ribotipos 014/020 y 078**

Los ribotipos 014/020 y 078 también son prevalentes en nuestro hospital y causaron el 15,5% y 21,1% de todos los casos estudiados, respectivamente. Sin embargo, apenas se encontraron eventos de transmisión hospitalaria, especialmente en el caso del ribotipo 014/020, en el que solamente el 3% de los casos estuvieron relacionados genética y epidemiológicamente.

En estos aislados se evidenció una gran diversidad filogenética, probablemente debida a numerosas introducciones independientes en el hospital, presumiblemente por pacientes colonizados desde la comunidad y sin una fuente de contagio común.

Ambos ribotipos están distribuidos globalmente y son prevalentes en muchas regiones de nuestro país (285), aunque por el momento se desconocen tanto sus reservorios como el modo de transmisión. Ambos ribotipos 014/020 y 078 son habituales en el ganado, especialmente en cerdos, y se ha especulado que pueden propagarse a través de la cadena alimenticia llegando a afectar a varios países (117, 327). Únicamente el ribotipo 078 suele ser resistente a la fluoroquinolonas (337), y también incorpora diversos genes de resistencia a tetraciclinas; algunos de ellos muy similares a los descritos en otras especies bacterianas frecuentemente asociadas al ganado, como *Campylobacter jejuni* (338).



La información que obtenemos de la secuenciación genómica aporta evidencia sobre los eventos de transmisión, particularmente en el ambiente hospitalario y en los ribotipos 027, 001 y 106, a diferencia de los ribotipos 078 y 014/20 asociados a la comunidad que se encuentran comúnmente en el ganado. Estos resultados van en consonancia con observaciones recientes en las que se ha demostrado que tienen lugar rutas de transmisión específicas de linajes a través de Europa (327) e indican además, que a nivel local, también pueden observarse patrones de transmisión distintos.

Como es obvio, los procesos epidémicos de nuestro hospital contribuyen a la epidemiología de un ecosistema sanitario mucho más amplio, donde también participan otros centros hospitalarios, centros de larga estancia, entre otros, de manera que los patógenos pueden haber entrado y salido del hospital junto con el desplazamiento de los pacientes y, por lo tanto, no podemos excluir que los brotes se hayan extendido más allá de nuestra institución. A nuestro hospital acuden pacientes de otras instituciones, aunque solamente hemos encontrado durante el periodo de estudio (segundo semestre de 2015) un individuo con ICD causada por el ribotipo 027 (paciente 027\_E, **Figura 24**), que había estado previamente en otro Hospital de Madrid donde se estaba produciendo un brote con el mismo ribotipo en ese momento (250). La cepa de este paciente tenía un genoma que era indistinguible de los otros dos aislados ribotipo 027 identificados en nuestro hospital también en ese tiempo, lo que sugiere que los dos brotes podrían haber estado interrelacionados. Sin embargo, para estudiar con mayor detalle si ambos brotes pudiesen estar conectados, sería necesario analizar conjuntamente las secuencias genómicas de los aislados de *C. difficile* de ambos hospitales.

### Eventos de transmisión

El análisis de los eventos de transmisión que se han empleado en la presente Tesis, se basan en el trabajo de Eyre *et al.* (17). Estos autores estimaron, mediante la diversidad genómica que encontraron entre múltiples aislados de *C. difficile* de diferentes pacientes y el cálculo de las tasas de evolución del microorganismo, que una diferencia  $\leq 2$  SNPs en el genoma core entre dos cepas de diferentes pacientes, podría estar relacionada con un evento de transmisión directa, mientras que una diferencia  $>10$  SNPs, excluía la relación epidemiológica (17).

Sorprendentemente, casi la mitad de los posibles eventos de transmisión encontrados en este trabajo se identificaron entre pacientes que no tenían un nexo

epidemiológico claro, aunque no podemos descartar la existencia de conexiones intermediarias no identificadas, como pacientes con ICD que no fueron sospechados por ser sujetos con cursos leves de la enfermedad o porque las cepas de *C. difficile* no hayan sido recuperadas a partir de los medios de cultivo. Asimismo, la toma de muestras suele ser incompleta en situaciones de brote, porque los pacientes colonizados de manera asintomática, que se postula que juegan un papel importante en la transmisión de *C. difficile*, rara vez son estudiados (97, 339). También se ha perdido la oportunidad de estudiar algunas cepas, debido a que no crecieron tras su archivo en el Servicio de Microbiología o bien crecieron en cultivos contaminados y fue imposible recuperarlas. Sin embargo, la estrategia de muestreo y el porcentaje de cepas estudiadas fue uniforme a lo largo de los tres años del estudio (**Figura 21**), y los casos de ICD que no estaban representados entre los aislados de *C. difficile* analizados se distribuyeron aleatoriamente; por lo que la ausencia de algunos aislados no debería haber producido sesgo en nuestros resultados, y es poco probable que un muestreo incompleto explique el motivo por el cual solamente el 17% de los receptores de los posibles eventos de transmisión identificados tuvieron contacto directo en el mismo Servicio Médico que sus eventuales fuentes de contagio.

Una proporción significativa de las transmisiones puede haber ocurrido de forma indirecta a través de la contaminación ambiental con esporas de *C. difficile* o a partir de reservorios que no son los propios pacientes con ICD, como pueden ser otros pacientes con distinta patología o el personal sanitario, que a su vez estuviesen colonizados asintomáticamente. La transmisión indirecta también puede explicar los largos intervalos de tiempo (es decir, >90 días, hasta un máximo de 847 días) entre las fechas de diagnóstico de ICD del presunto donador y receptor, en una gran proporción de los eventos de transmisión.

En cuatro de los eventos de transmisión, tanto el paciente donador como el receptor habían ocupado exactamente las mismas camas, aunque en dos de las parejas el tiempo transcurrido entre ambos hechos fue de 97 y 100 días, respectivamente. Este resultado proporciona un indicio de que el ambiente contaminado es un reservorio importante de *C. difficile*.

En 7 casos de adquisición comunitaria se identificó una relación genética y temporal con aislados clasificados como HA. En general se trató de pacientes sin ingreso hospitalario pero con antecedentes de intervenciones diagnósticas en el hospital o estancia en el Servicio de Urgencias, sugiriendo que estas infecciones se deberían a

una adquisición en el hospital y no en la comunidad. En el trabajo de Chitnis *et al.* (157), se describió que muy frecuentemente (82,1%), los casos clasificados como comunitarios tienen exposición a un ambiente sanitario, sin necesidad de estar ingresados. Este hecho tiene gran importancia a la hora de realizar estudios epidemiológicos y trazar las rutas de transmisión, ya que no se suele estudiar a los pacientes ambulatorios.

Las esporas de *C. difficile* pueden permanecer viables en el ambiente durante largos períodos de tiempo y su inactivación es bastante compleja. Se desconoce la dosis de esporas infectiva, pero la detección de *C. difficile* en distintas superficies de las habitaciones de los hospitales es muy frecuente (86). Está bien establecido que un factor de riesgo para el desarrollo de ICD es que el compañero de habitación o el paciente anterior hubiese padecido la infección (103, 160). Incluso se ha demostrado que el consumo de antibióticos del ocupante anterior de la cama o de la habitación aumenta el riesgo de ICD del siguiente ocupante de la misma, aunque el primero no hubiese padecido una ICD (106). Las esporas son capaces de sobrevivir a los procesos de lavado del material de camas en los hospitales y se han detectado esporas viables en cultivos ambientales de sábanas (340).

Debido a los frecuentes movimientos de los pacientes en el hospital, la adquisición de esporas de *C. difficile* también puede ocurrir a partir de superficies contaminadas fuera de las habitaciones de los pacientes. Por ejemplo, se ha comunicado recientemente que el contacto de los pacientes con ICD con zonas de procedimientos o con instrumentos de diagnóstico comunes (escáner de tomografía computarizada, unidades de resonancia magnética, etc.) aumenta las probabilidades de que los usuarios posteriores también desarrollen ICD (341). También se ha postulado el papel que puede jugar en la transmisión de *C. difficile* en los hospitales las sillas de ruedas, mediante un estudio en el que se obtuvieron un 25% de cultivos positivos en muestras tomadas de sillas de ruedas en un solo hospital, donde se registraron hasta 851 transportes en silla, en solo 3 días (342). Como consecuencia, las recomendaciones incluyen protocolos sobre la limpieza exhaustiva de las habitaciones de los pacientes y de los equipos de diagnóstico, así como sobre la formación reiterada del personal de limpieza y la realización de controles de calidad regularmente (294, 341). Confirmando que *C. difficile* no se transmite exclusivamente entre pacientes sintomáticos, se ha demostrado que el traslado de un hospital con habitaciones de 3-4 pacientes a otro de construcción nueva y habitaciones individuales con baño propio, no redujo la incidencia de ICD,

pero si se redujeron en cambio, las incidencias de colonización por *S. aureus* resistente a meticilina y la colonización e infección por *Enterococcus* resistente a vancomicina (343).

Alrededor del 8% de los pacientes pueden estar colonizados con CD de manera asintomática en el momento del ingreso en el hospital, lo que claramente contribuye a una transmisión oculta (143, 344). De hecho, hay trabajos previos que han demostrado mediante secuenciación de genomas, que los casos de ICD se relacionan con igual frecuencia con portadores asintomáticos que con pacientes con episodios de ICD previos (98, 345). La presencia en el mismo Servicio Médico de portadores asintomáticos aumenta casi al doble el riesgo de desarrollar ICD (97) y la identificación de portadores de *C. difficile* en el momento del ingreso hospitalario (mediante frotis rectal y TAAN de los genes codificadores de las toxinas) con el posterior aislamiento y con medidas de precaución de contacto, reduce la tasa de ICD en un 62% (346). Aunque los portadores asintomáticos tienen aproximadamente 15 veces menos probabilidad de transmitir *C. difficile* que los pacientes con ICD, sí contribuyen sustancialmente al mantenimiento de la prevalencia de ICD y a la diseminación de *C. difficile*, debido a que grupalmente son numerosos (93). La posible colonización intestinal de *C. difficile* en el personal sanitario es otro potencial reservorio del microorganismo que ha sido escasamente investigado.

Como parte de la tarea asistencial diaria de nuestro Servicio de Microbiología, se ha implantado un sistema de vigilancia epidemiológica en la que todos los casos en los que se detecta *C. difficile* se comunican inmediatamente al Servicio de Medicina Preventiva para iniciar las medidas de control apropiadas. El informe también se realiza al Servicio de Enfermedades Infecciosas para llevar a cabo el tratamiento oportuno. De acuerdo a los protocolos internos del Hospital Ramón y Cajal, se sospecha la existencia de un brote de ICD cuando se acumulan 3 o más casos nuevos de ICD en el mismo Servicio en un período de tiempo igual o menor a 7 días, o bien la presencia de 2 o más casos en una UCI en un período de tiempo igual o menor a 7 días. Ante una posible situación de brote, se notifica al personal sanitario del Servicio implicado y se refuerzan las medidas de control de infección de acuerdo con el Servicio de Medicina Preventiva.

Sin embargo, los datos de la vigilancia epidemiológica por sí solos no han sido suficientes para revelar el alcance de la continua propagación epidémica de *C. difficile* en nuestro Hospital. A excepción del brote ocurrido en Gastroenterología en el año 2013, no se han producido agrupaciones de casos en un reducido periodo de tiempo que

pudieran hacer sospechar de la existencia de eventos de transmisión hospitalaria, que por el contrario sí han sido revelados mediante la SGC, identificando hasta 17 clústeres de transmisión independientes afectando a 85 pacientes. Los trabajadores sanitarios no hemos sido conscientes de esta situación epidémica, ya que la incidencia general de la ICD se ha mantenido estable a niveles bajos y no alarmantes y las medidas de aislamiento eran adecuadas para prevenir la transmisión de *C. difficile* entre los pacientes.

Los estudios epidemiológicos de los últimos años, junto con la información obtenida de la SGC han cambiado el paradigma del modo de adquisición y transmisión de *C. difficile*, y se ha puesto de manifiesto una creciente frecuencia de ICD fuera del entorno hospitalario (110, 114), con transmisión relacionada con el mundo animal y alimentario (78, 116). También se ha evidenciado que las transmisiones en el hospital no se reducen a los pacientes sintomáticos, hay gran cantidad de factores y escenarios que aumentan las probabilidades de transmisión de este microorganismo, tales como portadores asintomáticos, equipos de diagnóstico, superficies, entre otros (17, 60, 341). Una importante conclusión de los trabajos que combinan epidemiología y tipificación molecular es que las precauciones de contacto en pacientes sintomáticos no son suficientes para frenar la transmisión de *C. difficile* (294–296). Finalmente es necesario aunar esfuerzos que combinen protocolos de limpieza exhaustivos, educación al personal sanitario, al de limpieza, a los pacientes y a los visitantes, junto con los programas PROA en los que se vele por un uso correcto de los antibióticos.

### **Brote Ribotipo 018**

Como se comentó anteriormente, el ribotipo 018 no es muy prevalente en nuestro país, pero es mayoritario en Italia donde tiene una alta endemicidad y ha causado numerosas situaciones de brotes (82, 252, 347). El ribotipo 018 ha causado brotes de ICD también en otros países europeos, como Francia y Alemania (253, 348). Fuera de Europa, otros países con elevada presencia de 018 son Japón y Corea (349, 350). Estudios *in vitro* han demostrado que las cepas pertenecientes al ribotipo 018 presentan mayor capacidad de esporulación y de producción de toxinas, lo que explicaría en parte una mayor capacidad de transmisión (252, 347).

Entre julio y agosto de 2013 se detectó un aumento de casos de ICD en el Servicio de Gastroenterología y Hepatología, e inmediatamente se pusieron en marcha medidas de prevención para contener la transmisión de *C. difficile* (181), que llegaron incluso al

cierre momentáneo del control de enfermería afectado. El ribotipo causante del brote fue el 018, en al menos en 6 de los 13 pacientes implicados. Además la caracterización de todas las cepas del año añadió otros 6 casos adicionales, lo que evidencia la utilidad de realizar estudios de vigilancia para controlar la epidemiología circulante y la introducción de nuevos clones (192). La SGC confirmó el nexo genómico entre los aislados del brote, validando esta herramienta para la epidemiología hospitalaria. El estudio molecular de estos casos evidenció además que la transmisión de este microorganismo con frecuencia ocurre indirectamente (17), como se demuestra por la implicación de hasta tres Servicios Médicos diferentes. Fuera del brote, este ribotipo solamente se ha identificado en otros 3 casos, no relacionados temporal ni epidemiológicamente (marzo de 2016, febrero de 2017 y noviembre de 2018).

Lamentablemente no pudimos dilucidar el origen del brote, pues no se caracterizó la totalidad de los casos de ICD, ni se tomaron muestras ambientales, ni se realizaron estudios en pacientes portadores. Sin embargo, la investigación de los casos implicados arroja suficiente evidencia para admitir que ocurrieron distintos eventos de transmisión ya que encontramos relación epidemiológica de espacio y tiempo entre los pacientes; además, la adquisición de *C. difficile* fue en todos los casos de origen hospitalario y la SGC demostró la relación clonal de las cepas.

### **Transferencia de Microbiota Fecal**

En los últimos años la TMF ha demostrado ser una opción terapéutica efectiva para el tratamiento de la ICDr o refractaria, con tasas de curación entre el 80-90%. Estos resultados prometedores han sido demostrados en numerosos ensayos clínicos (16, 351) y meta-análisis (204, 352). Existen variantes en cuanto a la vía de administración de las heces, siendo la colonoscopia con la que mejores resultados se han obtenido en comparación con la vía digestiva superior empleando cápsulas conteniendo heces liofilizadas o mediante enemas (353). Respecto al empleo de preparados de heces, frescos o congelados, los estudios no han encontrado diferencias significativas (354). Actualmente se está trabajando en la estandarización de un método común de TMF (355, 356), con el fin de hacer comparables los resultados entre los distintos ensayos clínicos o experiencias publicadas.

La TMF se realiza comúnmente como tratamiento de la ICDr en el segundo o tercer episodio de recurrencia (357, 358), sin embargo hay autores que proponen su uso incluso en el primer episodio de ICD (359), con el objetivo de reducir las posibilidades

de recurrencias. Para ello es necesario la existencia de bancos de heces con preparados de microbiota listos para su administración.

En el Hospital Ramón y Cajal se puso en marcha el primer programa consolidado de TMF en España. Todos los procedimientos se realizaron mediante colonoscopia y los donantes fueron mayormente familiares del paciente afectado por *C. difficile*. Se obtuvo una tasa de curación superior al 90% (360), lo que está en consonancia con la mayoría de los trabajos publicados.

Curiosamente en 3 de 4 pacientes en los que se recuperó una cepa de *C. difficile* posterior a la TFM, la SGC demostró que continuaron colonizados, al ser la misma cepa que causó los episodios de ICD previos. Aunque esta observación se basó en un número muy pequeño de casos ( $n=4$ ), puede justificar los estudios de seguimiento, ya que contrasta con una publicación reciente que documenta que el estado de portador asintomático después del TMF era muy infrecuente (2% después de una semana, 3% después de cuatro semanas) (361).

En general, se han informado pocos efectos adversos descritos tras el TMF y de existir, estos no son graves. Los más comunes incluyen estreñimiento, dolor abdominal, hinchazón, vómitos, diarrea y flatulencia (204). Estos efectos adversos son más habituales cuando se usa la administración por vía alta que la colonoscopia (362). Como hechos más destacables se han descrito complicaciones infecciosas, como una diarrea por norovirus (217) y recientemente, se comunicaron dos casos de bacteriemia post-TFM en pacientes inmunocomprometidos y muerte de uno de ellos en el que se aisló una cepa de *Escherichia coli* productora de beta-lactamasa de espectro extendido presente en las heces del donante (363). De acuerdo a la bibliografía publicada, se trata de un hecho puntual que no debería de haber ocurrido tras el despistaje de bacterias multirresistentes que se debe hacer de rutina en todas las heces de donantes, y que en este caso o no se realizó o no fue adecuado. Los estudios de donantes, además de estudios serológicos completos como las realizadas en cualquier donante de órgano sólido, deben de incluir siempre la búsqueda en heces de patógenos resistentes a los antimicrobianos.

Por el contrario, la TMF, en el contexto del tratamiento de la ICDr, ha permitido describir algunos efectos beneficiosos además de la cura de la diarrea. Se ha descrito la desaparición de infecciones del tracto urinario recurrentes o la erradicación de microorganismos multirresistentes (213, 215). En nuestra experiencia, hemos documentado el primer caso de erradicación intestinal de un microorganismo



multirresistente tras un TMF en España (214). Este resultado refuerza la supuesta utilidad de emplear este procedimiento para descolonizar a los pacientes. Sin embargo, de momento, la evidencia es insuficiente para realizar una recomendación a favor o en contra del TMF para la erradicación de microorganismos multirresistentes, siendo necesarios más estudios que avalen su eficacia (364).

Las potenciales indicaciones que se pueden atribuir al TMF son numerosas, sobre todo en trastornos gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal, el estreñimiento crónico y el síndrome de intestino irritable (365–367). La colitis ulcerosa es la patología en la que por el momento más se ha estudiado el TMF, obteniéndose resultados prometedores, pero aún insuficientes como para poder recomendar el TMF en guía terapéutica (368, 369).

Otras posibles aplicaciones son la obesidad, la esclerosis múltiple, la infección del VIH o el autismo (370–373). Sin embargo, aunque se han encontrado resultados favorables en todas las patologías anteriores, son necesarios aún ensayos clínicos que avalen su eficacia y seguridad en todos ellos.

### **Limitaciones del trabajo**

Debido a la naturaleza retrospectiva y descriptiva de este trabajo no se revisaron datos clínicos de los pacientes (ej. tratamientos recibidos) y quizás el número de nuevos casos de ICD y de ICDr puede estar sesgado. Sobre todo desde que se emplean sistemas de TAAN, con elevada sensibilidad, que pueden dar lugar a considerar casos de pacientes colonizados como verdaderas infecciones. También podría haber pacientes que hubiesen podido ser diagnosticados tanto de un episodio previo como de uno de recurrencia en otra institución y por tanto no constar en nuestro sistema informático. Como ya se ha comentado anteriormente, debido a la definición de nuevo caso, hay pacientes repetidos en el total de casos. Son pacientes que han tenido un nuevo episodio de ICD en un tiempo superior a 8 semanas, pudiendo así sobreestimar la incidencia de ICD, o infraestimar las recurrencias. El estudio no se diseñó para evaluar asociaciones clínicas (mortalidad, gravedad, riesgo de recurrencias) entre los distintos ribotipos.

Durante este trabajo, no hemos recogido muestras de ambientes o superficies hospitalarias y tampoco muestras de pacientes asintomáticos o de miembros del personal sanitario. Sin lugar a dudas, la inclusión de las superficies y del personal sanitario hubiera permitido comprender mucho mejor los reservorios y el modo de transmisión de *C. difficile*.



## CONCLUSIONES

---



**Primera.** La incidencia de ICD está aumentando en nuestro entorno (de 3,9 a 4,8 casos por 10.000 pacientes-día entre 2013 y 2018), aunque no llegamos a las tasas del resto de Europa (7,0 casos por 10.000 pacientes-día). Este aumento es aún mayor en los casos comunitarios (de 6,6 a 13,4 por 100.000 habitantes entre 2013 y 2018).

**Segunda.** En la ICD hemos pasado de una situación de marcado infradiagnóstico a una de sobrediagnóstico, favorecida por la elevada sensibilidad de las técnicas actuales y por el aumento de la sospecha clínica de la enfermedad.

**Tercera.** En esta tesis se ha puesto a punto e implementado la técnica de ribotipado mediante electroforesis capilar que ha permitido identificar 124 ribotipos diferentes entre nuestros aislados en el periodo 2013-2018. Se han identificado 5 ribotipos mayoritarios (078, 106, 014/020, 001 y 027), tanto en el ámbito hospitalario como en el comunitario. Estos 5 ribotipos son responsables del 60% de los episodios de ICD.

**Cuarta.** Se ha documentado la irrupción del ribotipo hiperepidémico e hipervirulento 027 en nuestro Hospital en 2014, y mediante la SGC se ha demostrado su transmisión clonal a 32 pacientes, revelando una situación de brote epidémico que no se había sospechado previamente. Actualmente existe una situación de endemicidad de este clon, lo que justifica su continua vigilancia.

**Quinta.** Se ha caracterizado molecularmente un brote del ribotipo 018 que afectó al menos a 12 pacientes. La estrecha colaboración entre todos los Servicios implicados permitió erradicar este brote.

**Sexta.** Globalmente, la SGC ha permitido detectar 17 clústeres de transmisión independientes, conteniendo cada uno entre 2 y 18 casos, que afectaron a 85 pacientes en total.

**Séptima.** Existe una frecuente transmisión nosocomial entre pacientes sin relación epidemiológica temporal o espacial y en periodos de tiempo muy superiores a los previamente establecidos (>90 días). Todos los datos apuntan a un papel importante de la persistencia de esporas en las superficies y el posible papel de los portadores

asintomáticos, entre los que se encuentra el personal sanitario. La SGC fue clave para poder descifrar los eventos de transmisión.

**Octava.** En la recurrencia de la infección se ha comprobado que en el 80% de los casos es debido a la recidiva de la misma cepa, mientras que en el 20% se trata de reinfecciones por cepas diferentes. Igualmente se han documentado situaciones de recidiva en periodos de tiempo superiores a 8 semanas, por lo que sería necesario revisar el criterio de temporalidad para definir adecuadamente las recurrencias.

**Novena.** A pesar de no conseguir la erradicación completa de *C. difficile*, la TMF se postula como una herramienta eficaz para curar la ICD. Otra aplicación de esta técnica podría ser la erradicación de la colonización intestinal de bacterias multirresistentes a los antibióticos.

**Décima.** El personal sanitario no ha sido consciente de la situación epidémica presente y las medidas de aislamiento se consideraron adecuadas para prevenir la transmisión. La SGC puede ser extremadamente útil para comprender la situación local de *C. difficile*. Por lo tanto, esta herramienta debe ser considerada para las políticas institucionales de prevención de los hospitales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

1. Hall IC. 1935. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 49:390.
2. Prévot, A.-R. 1938. "Études de systématique bactérienne. IV. Critique de la conception actuelle du genre *Clostridium*". Annales de l'Institut Pasteur. 61 (1): 84.
3. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. 2016. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe 40:95–99.
4. Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH. 1974. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Ann Intern Med 81:429–433.
5. Bartlett JG, Moon N, Chang TW, Taylor N, Onderdonk AB. 1978. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. Gastroenterology 75:778–782.
6. George WL, Sutter VL, Goldstein EJ, Ludwig SL, Finegold SM. 1978. Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. Lancet Lond Engl 1:802–803.
7. Finney JM. 1893. Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. Bulletin of the Johns Hopkins Hospital 1893;4:53-5.
8. Bartlett JG. 1994. *Clostridium difficile*: History of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clin Infect Dis 18:S265–S272.
9. Hummel RP, Altemeier WA, Hill EO. 1964. Iatrogenic staphylococcal enterocolitis. Ann Surg 160:551–560.
10. Green RH. 1974. The association of viral activation with penicillin toxicity in guinea pigs and hamsters. Yale J Biol Med 47:166–181.
11. Hafiz S. 1974. *Clostridium difficile* and its toxins [dissertation]. Leeds. United Kingdom: University of Leeds.
12. Archibald LK, Banerjee SN, Jarvis WR. 2004. Secular trends in hospital-acquired *Clostridium difficile* disease in the United States, 1987–2001. J Infect Dis 189:1585–1589.
13. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH. 2010. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev 23:529–549.
14. Martin JSH, Monaghan TM, Wilcox MH. 2016. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 13:206–216.
15. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Connor TR, Harris SR, Fairley D, Bamford KB, D'Arc S, Brazier J, Brown D, Coia JE, Douce G, Gerding D, Kim HJ, Koh TH, Kato H, Senoh M, Louie T, Michell S, Butt E, Peacock SJ, Brown NM, Riley T, Songer G, Wilcox M, Pirmohamed M, Kuijper E, Hawkey P, Wren BW, Dougan G, Parkhill J, Lawley TD. 2013. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. Nat Genet 45:109–113.
16. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JFW, Tijssen JGP, Speelman P, Dijkgraaf MGW, Keller JJ. 2013. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. N Engl J Med 368:407–415.
17. Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Ip CLC, Golubchik T, Batty EM, Finney JM, Wyllie DH, Didelot X, Piazza P, Bowden R, Dingle KE, Harding RM, Crook DW, Wilcox MH, Peto TEA, Walker AS. 2013. Diverse Sources of *Clostridium difficile* Infection Identified on Whole-Genome Sequencing. N Engl J Med 369:1195–1205.
18. Collins J, Robinson C, Danhof H, Knetsch CW, van Leeuwen HC, Lawley TD, Auchtung JM, Britton RA. 2018. Dietary trehalose enhances virulence of epidemic *Clostridium difficile*. Nature 553:291–294.
19. Hunt JJ, Ballard JD. 2013. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. Microbiol Mol Biol Rev 77:567–581.
20. Rineh A, Kelso MJ, Vatansever F, Tegos GP, Hamblin MR. 2014. *Clostridium difficile* infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics. Expert Rev Anti Infect Ther 12:131–150.

21. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7:526–536.
22. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181:29–38.
23. Brouwer MSM, Roberts AP, Hussain H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. 2013. Horizontal gene transfer converts non-toxicogenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun* 4:2601.
24. Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. 1995. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* 270:13932–13936.
25. Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375:500–503.
26. Wilcox MH, Fawley WN. 2001. Virulence of *Clostridium difficile* toxin A negative strains. *J Hosp Infect* 48:81.
27. Mani N, Dupuy B. 2001. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5844–5849.
28. Govind R, Dupuy B. 2012. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLOS Pathog* 8:e1002727.
29. Olling A, Seehase S, Minton NP, Tatge H, Schröter S, Kohlscheen S, Pich A, Just I, Gerhard R. 2012. Release of TcdA and TcdB from *Clostridium difficile* cdi 630 is not affected by functional inactivation of the tcdE gene. *Microb Pathog* 52:92–100.
30. Matamouros S, England P, Dupuy B. 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* 64:1274–1288.
31. Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. 1997. Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur J Biochem* 244:735–742.
32. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC. 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet Lond Engl* 366:1079–1084.
33. Oezguen N, Power TD, Urvil P, Feng H, Pothoulakis C, Stamler JS, Braun W, Savidge TC. 2012. Clostridial toxins: sensing a target in a hostile gut environment. *Gut Microbes* 3:35–41.
34. Janoir C. 2016. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* 37:13–24.
35. Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K. 1998. Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 37:5296–5304.
36. Shen A. 2012. *Clostridium difficile* toxins: mediators of inflammation. *J Innate Immun* 4:149–158.
37. Sun X, Hirota SA. 2015. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Mol Immunol* 63:193–202.
38. Awad MM, Johanesen PA, Carter GP, Rose E, Lyras D. 2014. *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes* 5:579–593.
39. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, Bergwerff AA, Dekker FW, Kuijper EJ. 2008. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 47:1162–1170.
40. Carman RJ, Stevens AL, Lyrly MW, Hiltonsmith MF, Stiles BG, Wilkins TD. 2011. *Clostridium difficile* binary toxin (CDT) and diarrhea. *Anaerobe* 17:161–165.
41. Gonçalves C, Decré D, Barbut F, Burghoffer B, Petit J-C. 2004. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 42:1933–1939.
42. Carter GP, Lyras D, Allen DL, Mackin KE, Howarth PM, O'Connor JR, Rood JI. 2007.



- Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. J Bacteriol 189:7290–7301.
43. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M, Hardt W-D, Wehland J, Aktories K. 2009. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. PLoS Pathog 5:e1000626.
  44. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. 2014. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. Gut Microbes 5:15–27.
  45. Bacci S, Mølbak K, Kjeldsen MK, Olsen KEP. 2011. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. Emerg Infect Dis 17:976–982.
  46. Goldenberg SD, French GL. 2011. Lack of association of tcdC type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. J Infect 62:355–362.
  47. Jump RLP, Pultz MJ, Donskey CJ. 2007. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and C. difficile-associated diarrhea? Antimicrob Agents Chemother 51:2883–2887.
  48. Baines SD, O'Connor R, Saxton K, Freeman J, Wilcox MH. 2009. Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. J Antimicrob Chemother 63:520–525.
  49. Ali S, Moore G, Wilson APR. 2011. Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants. J Hosp Infect 79:97–98.
  50. Higgins D, Dworkin J. 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiol Rev 36:131–148.
  51. Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. 2014. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. Trends Microbiol 22:406–416.
  52. Sorg JA, Sonenshein AL. 2008. Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. J Bacteriol 190:2505–2512.
  53. Howerton A, Ramirez N, Abel-Santos E. 2011. Mapping interactions between germinants and *Clostridium difficile* spores. J Bacteriol 193:274–282.
  54. Sorg JA, Sonenshein AL. 2009. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. J Bacteriol 191:1115–1117.
  55. Wilcox MH, Fawley WN. 2000. Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. Lancet Lond Engl 356:1324.
  56. Vohra P, Poxton IR. 2011. Comparison of toxin and spore production in clinically relevant strains of *Clostridium difficile*. Microbiol Read Engl 157:1343–1353.
  57. Burns DA, Heeg D, Cartman ST, Minton NP. 2011. Reconsidering the sporulation characteristics of hypervirulent *Clostridium difficile* BI/NAP1/027. PLoS ONE 6:e24894.
  58. Donskey CJ, Kundrapu S, Deshpande A. 2015. Colonization Versus Carriage of *Clostridium difficile*. Infect Dis Clin North Am 29:13–28.
  59. Crobach MJT, Vernon JJ, Loo VG, Kong LY, Péchiné S, Wilcox MH, Kuijper EJ. 2018. Understanding *Clostridium difficile* Colonization. Clin Microbiol Rev 31.
  60. Stoesser N, Eyre DW, Quan TP, Godwin H, Pill G, Mbuvi E, Vaughan A, Griffiths D, Martin J, Fawley W, Dingle KE, Oakley S, Wanelik K, Finney JM, Kachrimanidou M, Moore CE, Gorbach S, Riley TV, Crook DW, Peto TEA, Wilcox MH, Walker AS, Modernising Medical Microbiology Informatics Group (MMMIG). 2017. Epidemiology of *Clostridium difficile* in infants in Oxfordshire, UK: Risk factors for colonization and carriage, and genetic overlap with regional C. difficile infection strains. PLoS One 12:e0182307.
  61. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. 2016. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 22:S63–S81.
  62. González-Del Vecchio M, Álvarez-Uría A, Marin M, Alcalá L, Martín A, Montilla P, Bouza E. 2016. Clinical Significance of *Clostridium difficile* in Children Less Than 2 Years Old: A

- Case-Control Study. *Pediatr Infect Dis J* 35:281–285.
63. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, Bakken JS, Carroll KC, Coffin SE, Dubberke ER, Garey KW, Gould CV, Kelly C, Loo V, Shaklee Sammons J, Sandora TJ, Wilcox MH. 2018. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 66:e1–e48.
  64. Bolton RP, Tait SK, Dear PR, Losowsky MS. 1984. Asymptomatic neonatal colonisation by *Clostridium difficile*. *Arch Dis Child* 59:466–472.
  65. Lees EA, Miyajima F, Pirmohamed M, Carrol ED. 2016. The role of *Clostridium difficile* in the paediatric and neonatal gut - a narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 35:1047–1057.
  66. Samore MH, DeGirolami PC, Tlucko A, Lichtenberg DA, Melvin ZA, Karchmer AW. 1994. *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 18:181–187.
  67. Loo VG, Bourgault A-M, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Béliveau C, Oughton M, Brukner I, Dascal A. 2011. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N Engl J Med* 365:1693–1703.
  68. Alasmari F, Seiler SM, Hink T, Burnham C-AD, Dubberke ER. 2014. Prevalence and risk factors for asymptomatic *Clostridium difficile* carriage. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 59:216–222.
  69. Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. 1992. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J Infect Dis* 166:561–567.
  70. Kong LY, Dendukuri N, Schiller I, Bourgault A-M, Brassard P, Poirier L, Lamothe F, Béliveau C, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Frost EH, Gilca R, Dascal A, Loo VG. 2015. Predictors of asymptomatic *Clostridium difficile* colonization on hospital admission. *Am J Infect Control* 43:248–253.
  71. Tschudin-Sutter S, Carroll KC, Tamma PD, Sudekum ML, Frei R, Widmer AF, Ellis BC, Bartlett J, Perl TM. 2015. Impact of toxigenic *Clostridium difficile* colonization on the risk of subsequent *C. difficile* infection in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36:1324–1329.
  72. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. 1989. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 320:204–210.
  73. Hung Y-P, Lin H-J, Wu T-C, Liu H-C, Lee J-C, Lee C-I, Wu Y-H, Wan L, Tsai P-J, Ko W-C. 2013. Risk factors of fecal toxigenic or non-toxigenic *Clostridium difficile* colonization: impact of Toll-like receptor polymorphisms and prior antibiotic exposure. *PloS One* 8:e69577.
  74. Eyre DW, Griffiths D, Vaughan A, Golubchik T, Acharya M, O'Connor L, Crook DW, Walker AS, Peto TEA. 2013. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonisation and on ward transmission. *PLoS ONE* 8:e78445.
  75. Dubberke ER, Reske KA, Seiler S, Hink T, Kwon JH, Burnham C-AD. 2015. Risk factors for acquisition and loss of *Clostridium difficile* colonization in hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4533–4543.
  76. Leekha S, Aronhalt KC, Sloan LM, Patel R, Orenstein R. 2013. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization in a tertiary care hospital: admission prevalence and risk factors. *Am J Infect Control* 41:390–393.
  77. Zomer TP, VAN Duijkeren E, Wielders CCH, Veenman C, Hengeveld P, VAN DER Hoek W, DE Greeff SC, Smit L a. M, Heederik DJ, Yzermans CJ, Kuijper EJ, Maassen CBM. 2017. Prevalence and risk factors for colonization of *Clostridium difficile* among adults living near livestock farms in the Netherlands. *Epidemiol Infect* 145:2745–2749.
  78. van Dorp SM, Hensgens MPM, Dekkers OM, Demeulemeester A, Buiting A, Bloembergen P, de Greeff SC, Kuijper EJ. 2019. Spatial clustering and livestock exposure as risk factor for community-acquired *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 25:607–612.
  79. Loo VG, Oughton M, Bourgault A-M, Kelly M, Dewar K, Monczak Y. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 8.

80. Fawley WN, Davies KA, Morris T, Parnell P, Howe R, Wilcox MH, on behalf of the *Clostridium difficile* Ribotyping Network (CDRN) Working Group. 2016. Enhanced surveillance of *Clostridium difficile* infection occurring outside hospital, England, 2011 to 2013. *Eurosurveillance* 21.
81. Pépin J, Saheb N, Coulombe M-A, Alary M-E, Corriveau M-P, Authier S, Leblanc M, Rivard G, Bettez M, Primeau V, Nguyen M, Jacob C-E, Lanthier L. 2005. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 41:1254–1260.
82. Spigaglia P, Barbanti F, Dionisi AM, Mastrantonio P. 2010. *Clostridium difficile* isolates resistant to fluoroquinolones in Italy: Emergence of PCR Ribotype 018. *J Clin Microbiol* 48:2892–2896.
83. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT, Kuijper EJ. 2011. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet* 377:63–73.
84. Collins J, Danhof H, Britton RA. 2018. The role of trehalose in the global spread of epidemic *Clostridium difficile*. *Gut Microbes* 1–6.
85. Stabler RA, He M, Dawson L, Martin M, Valiente E, Corton C, Lawley TD, Sebaihia M, Quail MA, Rose G, Gerding DN, Gibert M, Popoff MR, Parkhill J, Dougan G, Wren BW. 2009. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol* 10:R102.
86. Gerding DN, Muto CA, Owens RC. 2008. Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 46 Suppl 1:S43–49.
87. Lawley TD, Croucher NJ, Yu L, Clare S, Sebaihia M, Goulding D, Pickard DJ, Parkhill J, Choudhary J, Dougan G. 2009. Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *J Bacteriol* 191:5377–5386.
88. Lawley TD, Clare S, Walker AW, Goulding D, Stabler RA, Croucher N, Mastroeni P, Scott P, Raisen C, Mottram L, Fairweather NF, Wren BW, Parkhill J, Dougan G. 2009. Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infect Immun* 77:3661–3669.
89. Zhang L, Dong D, Jiang C, Li Z, Wang X, Peng Y. 2015. Insight into alteration of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection and asymptomatic *C. difficile* colonization. *Anaerobe* 34:1–7.
90. Brown KA, Khanafer N, Daneman N, Fisman DN. 2013. Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2326–2332.
91. Park YH, Seong JM, Cho S, Han HW, Kim JY, An SH, Gwak HS. 2019. Effects of proton pump inhibitor use on risk of *Clostridium difficile* infection: a hospital cohort study. *J Gastroenterol*.
92. Donskey CJ. 2017. *Clostridium difficile* in older adults. *Infect Dis Clin North Am* 31:743–756.
93. Durham DP, Olsen MA, Dubberke ER, Galvani AP, Townsend JP. 2016. Quantifying transmission of *Clostridium difficile* within and outside healthcare settings. *Emerg Infect Dis* 22:608–616.
94. Sethi AK, Al-Nassir WN, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Donskey CJ. 2010. Persistence of skin contamination and environmental shedding of *Clostridium difficile* during and after treatment of *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31:21–27.
95. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH, Dingle KE, Harding RM, O'Connor L, Griffiths D, Vaughan A, Finney J, Wilcox MH, Crook DW, Peto TEA. 2012. Characterisation of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS Med* 9:e1001172.
96. Kohler P, Bregenzer-Witteck A, Rafeiner P, Schlegel M. 2013. Presumably hospital-transmitted *Clostridium difficile* infections based on epidemiological linkage. *Swiss Med Wkly* 143:w13824.
97. Blixt T, Gradel KO, Homann C, Seidelin JB, Schønning K, Lester A, Houlind J, Stangerup M, Gottlieb M, Knudsen JD. 2017. Asymptomatic carriers contribute to nosocomial *Clostridium*

- difficile* Infection: A cohort study of 4508 patients. *Gastroenterology* 152:1031-1041.e2.
98. Curry SR, Muto CA, Schlackman JL, Pasculle AW, Shutt KA, Marsh JW, Harrison LH. 2013. Use of multilocus variable number of tandem repeats analysis genotyping to determine the role of asymptomatic carriers in *Clostridium difficile* transmission. *Clin Infect Dis* 57:1094–1102.
  99. Lanzas C, Dubberke ER, Lu Z, Reske KA, Gröhn YT. 2011. Epidemiological model for *Clostridium difficile* transmission in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32:553–561.
  100. Friedman ND, Pollard J, Stupart D, Knight DR, Khajehnoori M, Davey EK, Parry L, Riley TV. 2013. Prevalence of *Clostridium difficile* colonization among healthcare workers. *BMC Infect Dis* 13:459.
  101. Säll O, Johansson K, Norén T. 2015. Low colonization rates of *Clostridium difficile* among patients and healthcare workers at Örebro University Hospital in Sweden. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 123:240–244.
  102. Landelle C, Verachten M, Legrand P, Girou E, Barbut F, Brun-Buisson C, Buisson CB. 2014. Contamination of healthcare workers' hands with *Clostridium difficile* spores after caring for patients with *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35:10–15.
  103. Shaughnessy MK, Micielli RL, DePestel DD, Arndt J, Strachan CL, Welch KB, Chenoweth CE. 2011. Evaluation of hospital room assignment and acquisition of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32:201–206.
  104. Jou J, Ebrahim J, Shofer FS, Hamilton KW, Stern J, Han JH, CDC Prevention Epicenters Program. 2015. Environmental transmission of *Clostridium difficile*: association between hospital room size and *C. difficile* Infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36:564–568.
  105. Jia H, Du P, Yang H, Zhang Y, Wang J, Zhang W, Han G, Han N, Yao Z, Wang H, Zhang J, Wang Z, Ding Q, Qiang Y, Barbut F, Gao GF, Cao Y, Cheng Y, Chen C. 2016. Nosocomial transmission of *Clostridium difficile* ribotype 027 in a Chinese hospital, 2012–2014, traced by whole genome sequencing. *BMC Genomics* 17.
  106. Freedberg DE, Salmasian H, Cohen B, Abrams JA, Larson EL. 2016. Receipt of antibiotics in hospitalized patients and risk for *Clostridium difficile* infection in subsequent patients who occupy the same bed. *JAMA Intern Med* 176:1801.
  107. Kim KH, Fekety R, Batts DH, Brown D, Cudmore M, Silva J, Waters D. 1981. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 143:42–50.
  108. Biswas JS, Patel A, Otter JA, van Kleef E, Goldenberg SD. 2015. Contamination of the hospital environment from potential *Clostridium difficile* excretors without active infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 36:975–977.
  109. Khanna S, Pardi DS. 2010. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4:409–416.
  110. Khanna S, Pardi DS, Aronson SL, Kammer PP, Orenstein R, St Sauver JL, Harmsen WS, Zinsmeister AR. 2012. The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 107:89–95.
  111. Barbut F, Day N, Bouée S, Youssouf A, Grandvoinnet L, Lalande V, Couturier J, Eckert C. 2019. Toxigenic *Clostridium difficile* carriage in general practice: results of a laboratory-based cohort study. *Clin Microbiol Infect* 25:588–594.
  112. Yakob L, Riley TV, Paterson DL, Clements AC. 2013. *Clostridium difficile* exposure as an insidious source of infection in healthcare settings: an epidemiological model. *BMC Infect Dis* 13:376.
  113. Alvarez-Perez S, Blanco JL, Bouza E, Alba P, Gibert X, Maldonado J, Garcia ME. 2009. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet Microbiol* 137:302–305.
  114. Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MGJ, de Boer E, Lipman LJA, Kuijper EJ. 2012. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clin Microbiol Infect* 18:635–645.
  115. Peláez T, Alcalá L, Blanco JL, Álvarez-Pérez S, Marín M, Martín-López A, Catalán P, Reigadas E, García ME, Bouza E. 2013. Characterization of swine isolates of *Clostridium difficile* in

- Spain: a potential source of epidemic multidrug resistant strains? *Anaerobe* 22:45–49.
116. Knetsch CW, Kumar N, Forster SC, Connor TR, Browne HP, Harmanus C, Sanders IM, Harris SR, Turner L, Morris T, Perry M, Miyajima F, Roberts P, Pirmohamed M, Songer JG, Weese JS, Indra A, Corver J, Rupnik M, Wren BW, Riley TV, Kuijper EJ, Lawley TD. 2017. Zoonotic transfer of *Clostridium difficile* harboring antimicrobial resistance between farm animals and humans. *J Clin Microbiol JCM*.01384-17.
  117. Knight DR, Squire MM, Collins DA, Riley TV. 2017. Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 014 lineage in Australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission. *Front Microbiol* 7.
  118. Knetsch C, Connor T, Mutreja A, van Dorp S, Sanders I, Browne H, Harris D, Lipman L, Keessen E, Corver J, Kuijper E, Lawley T. 2014. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. *Eurosurveillance* 19:20954.
  119. Álvarez-Pérez S, Blanco JL, Harmanus C, Kuijper EJ, García ME. 2017. Prevalence and characteristics of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in dogs and cats attended in diverse veterinary clinics from the Madrid region. *Anaerobe* 48:47–55.
  120. Andrés-Lasheras S, Martín-Burriel I, Mainar-Jaime RC, Morales M, Kuijper E, Blanco JL, Chirino-Trejo M, Bolea R. 2018. Preliminary studies on isolates of *Clostridium difficile* from dogs and exotic pets. *BMC Vet Res* 14:77.
  121. Orden C, Neila C, Blanco JL, Álvarez-Pérez S, Harmanus C, Kuijper EJ, García ME. 2018. Recreational sandboxes for children and dogs can be a source of epidemic ribotypes of *Clostridium difficile*. *Zoonoses Public Health* 65:88–95.
  122. Loo VG, Brassard P, Miller MA. 2016. Household transmission of *Clostridium difficile* to family members and domestic pets. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37:1342–1348.
  123. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 13:485–487.
  124. Bouttier S, Barc M-C, Felix B, Lambert S, Collignon A, Barbut F. 2010. *Clostridium difficile* in ground meat, France. *Emerg Infect Dis* 16:733–735.
  125. Gould LH, Limbago B. 2010. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 51:577–582.
  126. al Saif N, Brazier JS. 1996. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol* 45:133–137.
  127. Xu C, Weese JS, Flemming C, Odumeru J, Warriner K. 2014. Fate of *Clostridium difficile* during wastewater treatment and incidence in southern Ontario watersheds. *J Appl Microbiol* 117:891–904.
  128. Moono P, Lim SC, Riley TV. 2017. High prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* in public space lawns in Western Australia. *Sci Rep* 7:41196.
  129. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ. 2013. Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Eurosurveillance* 18.
  130. Alcalá L, Marín M, Mena A, Niubó J. 2015. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. 53. Alcalá Hernández L (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.
  131. Janezic S, Rupnik M. 2010. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 646:55–65.
  132. Fawley WN, Knetsch CW, MacCannell DR, Harmanus C, Du T, Mulvey MR, Paulick A, Anderson L, Kuijper EJ, Wilcox MH. 2015. Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for *Clostridium difficile*. *PloS One* 10:e0118150.
  133. Gürtler V. 1993. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *J Gen Microbiol* 139:3089–3097.

134. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. 1999. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiol Lett 175:261–266.
135. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. 1999. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol 37:461–463.
136. Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, Wewalka G, Allerberger F, Kuijper EJ. 2008. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. J Med Microbiol 57:1377–1382.
137. Clabots CR, Johnson S, Bettin KM, Mathie PA, Mulligan ME, Schaberg DR, Peterson LR, Gerding DN. 1993. Development of a rapid and efficient restriction endonuclease analysis typing system for *Clostridium difficile* and correlation with other typing systems. J Clin Microbiol 31:1870–1875.
138. Kristjánsson M, Samore MH, Gerding DN, DeGirolami PC, Bettin KM, Karchmer AW, Arbeit RD. 1994. Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. J Clin Microbiol 32:1963–1969.
139. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, Golubchik T, Harding RM, Jeffery KJM, Jolley KA, Kirton R, Peto TE, Rees G, Stoesser N, Vaughan A, Walker AS, Young BC, Wilcox M, Dingle KE. 2010. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 48:770–778.
140. Huber CA, Foster NF, Riley TV, Paterson DL. 2013. Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods. J Clin Microbiol 51:2810–2814.
141. Marsh JW, O'Leary MM, Shutt KA, Pasculle AW, Johnson S, Gerding DN, Muto CA, Harrison LH. 2006. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis for investigation of *Clostridium difficile* transmission in Hospitals. J Clin Microbiol 44:2558–2566.
142. van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, Klaassen CHW, Kuijper EJ. 2007. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. J Clin Microbiol 45:1024–1028.
143. Kong LY, Eyre DW, Corbeil J, Raymond F, Walker AS, Wilcox MH, Crook DW, Michaud S, Toye B, Frost E, Dendukuri N, Schiller I, Bourgault A-M, Dascal A, Oughton M, Longtin Y, Poirier L, Brassard P, Turgeon N, Gilca R, Loo VG. 2018. *Clostridium difficile*: Investigating transmission patterns between infected and colonized patients using whole genome sequencing. Clin Infect Dis.
144. Elliott B, Androga GO, Knight DR, Riley TV. 2017. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis 49:1–11.
145. Knoop FC, Owens M, Crocker IC. 1993. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. Clin Microbiol Rev 6:251–265.
146. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. 2014. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 20:1–26.
147. Ooijevaar RE, van Beurden YH, Terveer EM, Goorhuis A, Bauer MP, Keller JJ, Mulder CJJ, Kuijper EJ. 2018. Update of treatment algorithms for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 24:452–462.
148. Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS. 2009. Clinical risk factors for severe *Clostridium difficile*-associated disease. Emerg Infect Dis 15:415–422.
149. Dallal RM, Harbrecht BG, Boujoukas AJ, Sirio CA, Farkas LM, Lee KK, Simmons RL. 2002. Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications. Ann Surg 235:363–372.
150. Miller M, Gravel D, Mulvey M, Taylor G, Boyd D, Simor A, Gardam M, McGeer A, Hutchinson J, Moore D, Kelly S. 2010. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 50:194–201.
151. Walker AS, Eyre DW, Wyllie DH, Dingle KE, Griffiths D, Shine B, Oakley S, O'Connor L, Finney J, Vaughan A, Crook DW, Wilcox MH,

- Peto TEA, Infections in Oxfordshire Research Database. 2013. Relationship between bacterial strain type, host biomarkers, and mortality in *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 56:1589–1600.
152. Pépin J, Valiquette L, Alary M-E, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pépin K, Chouinard D. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicales Can 171:466–472.
  153. Hensgens MPM, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ. 2012. Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. J Antimicrob Chemother 67:742–748.
  154. Stevens V, Dumyati G, Fine LS, Fisher SG, van Wijngaarden E. 2011. Cumulative antibiotic exposures over time and the risk of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 53:42–48.
  155. Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N. 2003. Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhoea. J Hosp Infect 54:243–245.
  156. Monge D, Morosini M, Millán I, Pérez Canosa C, Manso M, Guzman MF, Asensio A. 2011. Factores de riesgo de infección por *Clostridium difficile* en pacientes hospitalizados. Med Clínica 137:575–580.
  157. Chitnis AS, Holzbauer SM, Belflower RM, Winston LG, Bamberg WM, Lyons C, Farley MM, Dumyati GK, Wilson LE, Beldavs ZG, Dunn JR, Gould LH, MacCannell DR, Gerding DN, McDonald LC, Lessa FC. 2013. Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. JAMA Intern Med 173:1359–1367.
  158. Janarthanan S, Ditah I, Adler DG, Ehrinpreis MN. 2012. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and proton pump inhibitor therapy: a meta-analysis. Am J Gastroenterol 107:1001–1010.
  159. Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Silva J. 1981. Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. Am J Med 70:906–908.
  160. Echaiz JF, Veras L, Zervos M, Dubberke E, Johnson L. 2014. Hospital roommates and development of health care-onset *Clostridium difficile* infection. Am J Infect Control 42:1109–1111.
  161. Ginaldi L, Loreto MF, Corsi MP, Modesti M, De Martinis M. 2001. Immunosenescence and infectious diseases. Microbes Infect 3:851–857.
  162. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE. 1990. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. J Infect Dis 162:678–684.
  163. Kyne L, Sougioultzis S, McFarland LV, Kelly CP. 2002. Underlying disease severity as a major risk factor for nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. Infect Control Hosp Epidemiol 23:653–659.
  164. Bignardi GE. 1998. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. J Hosp Infect 40:1–15.
  165. Poutanen SM, Simor AE. 2004. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicales Can 171:51–58.
  166. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, Gorbach S, Sears P, Shue Y-K, OPT-80-003 Clinical Study Group. 2011. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 364:422–431.
  167. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C, Rolston DDK, Hernandez AV, Donskey CJ, Fraser TG. 2015. Risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. Infect Control Hosp Epidemiol 36:452–460.
  168. Kelly CP. 2012. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 18 Suppl 6:21–27.
  169. Johnson S. 2009. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. J Infect 58:403–410.
  170. Asensio Á, Bouza E, Grau S, Rubio-Rodríguez D, Rubio-Terrés C. 2013. Cost of *Clostridium difficile* associated diarrhea in Spain. Rev Esp Salud Publica 87:25–33.

171. Chilton CH, Pickering DS, Freeman J. 2018. Microbiologic factors affecting *Clostridium difficile* recurrence. Clin Microbiol Infect 24:476–482.
172. Gerding DN. 2016. Editorial Commentary: Whole-Genome Sequencing of *Clostridium difficile*: Exquisitely Sensitive but Not Yet Optimally Applied. Clin Infect Dis 62:753–754.
173. Larrainzar-Coghen T, Rodríguez-Pardo D, Puig-Asensio M, Rodríguez V, Ferrer C, Bartolomé R, Pigrau C, Fernández-Hidalgo N, Pumarola T, Almirante B. 2016. First recurrence of *Clostridium difficile* infection: clinical relevance, risk factors, and prognosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol 35:371–378.
174. Figueroa I, Johnson S, Sambol SP, Goldstein EJC, Citron DM, Gerding DN. 2012. Relapse versus reinfection: recurrent *Clostridium difficile* infection following treatment with fidaxomicin or vancomycin. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 55 Suppl 2:S104–109.
175. Mac Aogáin M, Moloney G, Kilkenny S, Kelleher M, Kelleghan M, Boyle B, Rogers TR. 2015. Whole-genome sequencing improves discrimination of relapse from reinfection and identifies transmission events among patients with recurrent *Clostridium difficile* infections. J Hosp Infect 90:108–116.
176. Durovic A, Widmer AF, Frei R, Tschudin-Sutter S. 2017. Distinguishing *Clostridium difficile* recurrence from reinfection: Independent validation of current recommendations. Infect Control Hosp Epidemiol 38:891–896.
177. Oka K, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Okazaki M, Manzoku T, Takahashi M, Tanaka M, Taguchi H, Watanabe T, Inamatsu T, Kamiya S. 2012. Molecular and microbiological characterization of *Clostridium difficile* isolates from single, relapse, and reinfection cases. J Clin Microbiol 50:915–921.
178. Eyre DW, Walker AS, Griffiths D, Wilcox MH, Wyllie DH, Dingle KE, Crook DW, Peto TEA. 2012. *Clostridium difficile* Mixed infection and reinfection: Fig 1. J Clin Microbiol 50:142–144.
179. Kumar N, Miyajima F, He M, Roberts P, Swale A, Ellison L, Pickard D, Smith G, Molyneux R, Dougan G, Parkhill J, Wren BW, Parry CM, Pirmohamed M, Lawley TD. 2016. Genome-Based Infection Tracking Reveals Dynamics of *Clostridium difficile* Transmission and Disease Recurrence. Clin Infect Dis 62:746–752.
180. Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. 2015. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. JAMA 313:398–408.
181. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, Pepin J, Wilcox MH. 2010. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol 31:431–455.
182. Bauer MP, Hensgens MPM, Miller MA, Gerding DN, Wilcox MH, Dale AP, Fawley WN, Kuijper EJ, Gorbach SL. 2012. Renal failure and leukocytosis are predictors of a complicated course of *Clostridium difficile* infection if measured on day of diagnosis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 55:S149–S153.
183. Sherwood RA. 2012. Faecal markers of gastrointestinal inflammation. J Clin Pathol 65:981–985.
184. Swale A, Miyajima F, Roberts P, Hall A, Little M, Beadsworth MJB, Beeching NJ, Kolamunnage-Dona R, Parry CM, Pirmohamed M. 2014. Calprotectin and lactoferrin faecal levels in patients with *Clostridium difficile* infection (CDI): a prospective cohort study. PloS One 9:e106118.
185. Barbut F, Gouot C, Lapidus N, Suzon L, Syed-Zaidi R, Lalande V, Eckert C. 2017. Faecal lactoferrin and calprotectin in patients with *Clostridium difficile* infection: a case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol 36:2423–2430.
186. Hu MY, Katchar K, Kyne L, Maroo S, Tummala S, Dreisbach V, Xu H, Leffler DA, Kelly CP. 2009. Prospective derivation and validation of a clinical prediction rule for recurrent *Clostridium difficile* infection. Gastroenterology 136:1206–1214.
187. D’Agostino RB, Collins SH, Pencina KM, Kean Y, Gorbach S. 2014. Risk estimation for recurrent *Clostridium difficile* infection based on clinical factors. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 58:1386–1393.
188. Cobo J, Merino E, Martínez C, Cózar-Llistó A, Shaw E, Marrodán T, Calbo E, Bereciartúa E,



- Sánchez-Muñoz LA, Salavert M, Pérez-Rodríguez MT, García-Rosado D, Bravo-Ferrer JM, Gálvez-Acebal J, Henríquez-Camacho C, Cuquet J, Pino-Calm B, Torres L, Sánchez-Porto A, Fernández-Félix BM. 2017. Prediction of recurrent *Clostridium difficile* infection at the bedside: the GEIH-CDI score. *Int J Antimicrob Agents*.
189. Daniels LM, Kufel WD. 2018. Clinical review of *Clostridium difficile* infection: an update on treatment and prevention. *Expert Opin Pharmacother* 19:1759–1769.
190. Bartlett JG. 1994. How to identify the cause of antibiotic-associated diarrhea. *J Crit Illn* 9:1063–1067.
191. Rodríguez-Pardo D, Mirelis B, Navarro F. 2013. Infections caused by *Clostridium difficile*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31:254–263.
192. Krutova M, Kinross P, Barbut F, Hajdu A, Wilcox M, Kuijper E. 2017. How to: Surveillance of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Infect*.
193. Shetty N, Wren MWD, Coen PG. 2011. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of *Clostridium difficile* in faecal samples: a meta-analysis. *J Hosp Infect* 77:1–6.
194. Nagy E. 2017. What do we know about the diagnostics, treatment and epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in Europe? *J Infect Chemother*.
195. Reigadas E, Alcalá L, Valerio M, Marín M, Martín A, Bouza E. 2016. Toxin B PCR cycle threshold as a predictor of poor outcome of *Clostridium difficile* infection: a derivation and validation cohort study. *J Antimicrob Chemother* 71:1380–1385.
196. Garvey MI, Bradley CW, Wilkinson MAC, Holden E. 2017. Can a toxin gene NAAT be used to predict toxin EIA and the severity of *Clostridium difficile* infection? *Antimicrob Resist Infect Control* 6:127.
197. Origüen J, Corbella L, Orellana Má., Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, San Juan R, Lizasoain M, Ruiz-Merlo T, Morales-Cartagena A, Maestro G, Parra P, Villa J, Delgado R, Aguado JM. 2017. Comparison of the clinical course of *Clostridium difficile* infection in glutamate dehydrogenase-positive toxin-negative patients diagnosed by PCR to those with a positive toxin test. *Clin Microbiol Infect*.
198. Aichinger E, Schleck CD, Harmsen WS, Nyre LM, Patel R. 2008. Nonutility of repeat laboratory testing for detection of *Clostridium difficile* by use of PCR or enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 46:3795–3797.
199. Cardona DM, Rand KH. 2008. Evaluation of repeat *Clostridium difficile* enzyme immunoassay testing. *J Clin Microbiol* 46:3686–3689.
200. Guerrero DM, Chou C, Jury LA, Nerandzic MM, Cadnum JC, Donskey CJ. 2011. Clinical and infection control implications of *Clostridium difficile* infection with negative enzyme immunoassay for toxin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 53:287–290.
201. Tullus K, Aronsson B, Marcus S, Möllby R. 1989. Intestinal colonization with *Clostridium difficile* in infants up to 18 months of age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 8:390–393.
202. Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K, Sears P, Gorbach S, OPT-80-004 Clinical Study Group. 2012. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 12:281–289.
203. Moayyedi P, Yuan Y, Baharath H, Ford AC. 2017. Faecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review of randomised controlled trials. *Med J Aust* 207:166–172.
204. Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, Moore D, Price M, Sharma N, Iqbal TH. 2017. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 46:479–493.
205. Ooijsaar RE, Terveer EM, Verspaget HW, Kuijper EJ, Keller JJ. 2018. Clinical application and potential of Fecal Microbiota Transplantation 17.
206. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, Sokol H, Arkkila P, Pintus C, Hart A, Segal J, Aloï M, Masucci L, Molinaro A, Scaldaferri F, Gasbarrini

- G, Lopez-Sanroman A, Link A, de Groot P, de Vos WM, Högenauer C, Malfertheiner P, Mattila E, Milosavljević T, Nieuwdorp M, Sanguinetti M, Simren M, Gasbarrini A, European FMT Working Group. 2017. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 66:569–580.
207. Lee CH, Steiner T, Petrof EO, Smieja M, Roscoe D, Nematallah A, Weese JS, Collins S, Moayyedi P, Crowther M, Ropeleski MJ, Jayaratne P, Higgins D, Li Y, Rau NV, Kim PT. 2016. Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 315:142–149.
208. Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, Armstrong D, Marshall JK, Kassam Z, Reinisch W, Lee CH. 2015. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 149:102–109.e6.
209. Costello SP, Soo W, Bryant RV, Jairath V, Hart AL, Andrews JM. 2017. Systematic review with meta-analysis: faecal microbiota transplantation for the induction of remission for active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 46:213–224.
210. Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, van den Bogaerde J, Samuel D, Leong RWL, Connor S, Ng W, Paramsothy R, Xuan W, Lin E, Mitchell HM, Borody TJ. 2017. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 389:1218–1228.
211. Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, Castaño-Rodríguez N. 2017. Faecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis* 11:1180–1199.
212. Bajaj JS, Kassam Z, Fagan A, Gavis EA, Liu E, Cox IJ, Kheradman R, Heuman D, Wang J, Gurry T, Williams R, Sikaroodi M, Fuchs M, Alm E, John B, Thacker LR, Riva A, Smith M, Taylor-Robinson SD, Gillevet PM. 2017. Fecal microbiota transplant from a rational stool donor improves hepatic encephalopathy: A randomized clinical trial. *Hepatology Baltim Md* 66:1727–1738.
213. Lagier JC, Million M, Fournier PE, Brouqui P, Raoult D. 2015. Faecal microbiota transplantation for stool decolonization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 90:173–174.
214. García-Fernández S, Morosini M-I, Cobo M, Foruny JR, López-Sanromán A, Cobo J, Romero J, Cantón R, Del Campo R. 2016. Gut eradication of VIM-1 producing ST9 *Klebsiella oxytoca* after fecal microbiota transplantation for diarrhea caused by a *Clostridium difficile* hypervirulent R027 strain. *Diagn Microbiol Infect Dis* 86:470–471.
215. Bilinski J, Grzesiowski P, Sorensen N, Madry K, Muszynski J, Robak K, Wroblewska M, Dzieciatkowski T, Dulny G, Dwilewicz-Trojaczek J, Wiktor-Jedrzejczak W, Basak GW. 2017. Fecal microbiota transplantation in patients with blood disorders inhibits gut colonization with antibiotic-resistant bacteria: Results of a prospective, single-center study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 65:364–370.
216. Davido B, Batista R, Dinh A, de Truchis P, Terveer E, Roberts B, Kuijper EJ, Caballero S. 2019. Fifty shades of graft: how to improve efficacy of Fecal Microbiota Transplantation (FMT) for decolonization of Antibiotic-Resistant Bacteria (ARB)? *Int J Antimicrob Agents*.
217. Schwartz M, Gluck M, Koon S. 2013. Norovirus gastroenteritis after fecal microbiota transplantation for treatment of *Clostridium difficile* infection despite asymptomatic donors and lack of sick contacts. *Am J Gastroenterol* 108:1367.
218. Quera R, Espinoza R, Estay C, Rivera D. 2014. Bacteremia as an adverse event of fecal microbiota transplantation in a patient with Crohn's disease and recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Crohns Colitis* 8:252–253.
219. Azimirad M, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, Kelly CR. 2019. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infection as an adverse event after faecal microbiota transplantation in two patients with ulcerative colitis and recurrent *Clostridium difficile* infection: A neglected agent in donor screening. *J Crohns Colitis*.
220. Bartlett JG. 2017. Bezlotoxumab - A New Agent for *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* 376:381–382.

221. Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, Cornely OA, Rahav G, Bouza E, Lee C, Jenkin G, Jensen W, Kim Y-S, Yoshida J, Gabryelski L, Pedley A, Eves K, Tipping R, Guris D, Kartsonis N, Dorr M-B, MODIFY I and MODIFY II Investigators. 2017. Bezlotoxumab for prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 376:305–317.
222. Markham A. 2016. Bezlotoxumab: First global approval. *Drugs* 76:1793–1798.
223. Kufel WD, Devanathan AS, Marx AH, Weber DJ, Daniels LM. 2017. Bezlotoxumab: A novel agent for the prevention of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 37:1298–1308.
224. Orth P, Xiao L, Hernandez LD, Reichert P, Sheth PR, Beaumont M, Yang X, Murgolo N, Ermakov G, DiNunzio E, Racine F, Karczewski J, Secore S, Ingram RN, Mayhood T, Strickland C, Therien AG. 2014. Mechanism of action and epitopes of *Clostridium difficile* toxin B-neutralizing antibody bezlotoxumab revealed by x-ray crystallography. *J Biol Chem* 289:18008–18021.
225. Scaiola A, Leibundgut M, Boehringer D, Caspers P, Bur D, Locher HH, Rueedi G, Ritz D. 2019. Structural basis of translation inhibition by cadazolid, a novel quinoxolidinone antibiotic. *Sci Rep* 9:5634.
226. Baldoni D, Gutierrez M, Timmer W, Dingemans J. 2014. Cadazolid, a novel antibiotic with potent activity against *Clostridium difficile*: safety, tolerability and pharmacokinetics in healthy subjects following single and multiple oral doses. *J Antimicrob Chemother* 69:706–714.
227. Chilton CH, Crowther GS, Baines SD, Todhunter SL, Freeman J, Locher HH, Athanasiou A, Wilcox MH. 2014. In vitro activity of cadazolid against clinically relevant *Clostridium difficile* isolates and in an in vitro gut model of *C. difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 69:697–705.
228. Locher HH, Caspers P, Bruyère T, Schroeder S, Pfaff P, Knezevic A, Keck W, Ritz D. 2014. Investigations of the mode of action and resistance development of cadazolid, a new antibiotic for treatment of *Clostridium difficile* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 58:901–908.
229. Gerding DN, Cornely OA, Grill S, Kracker H, Marrast AC, Nord CE, Talbot GH, Buitrago M, Gheorghe Diaconescu I, Murta de Oliveira C, Preotescu L, Pullman J, Louie TJ, Wilcox MH. 2019. Cadazolid for the treatment of *Clostridium difficile* infection: results of two double-blind, placebo-controlled, non-inferiority, randomised phase 3 trials. *Lancet Infect Dis* 19:265–274.
230. Mascio CTM, Mortin LI, Howland KT, Van Praagh ADG, Zhang S, Arya A, Chuong CL, Kang C, Li T, Silverman JA. 2012. In vitro and in vivo characterization of CB-183,315, a novel lipopeptide antibiotic for treatment of *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5023–5030.
231. Reigadas E, Alcalá L, Marín M, Pelaéz T, Martín A, Iglesias C, Bouza E. 2015. In vitro activity of surotomycin against contemporary clinical isolates of toxigenic *Clostridium difficile* strains obtained in Spain. *J Antimicrob Chemother* 70:2311–2315.
232. Chilton CH, Crowther GS, Todhunter SL, Nicholson S, Freeman J, Chesnel L, Wilcox MH. 2014. Efficacy of surotomycin in an in vitro gut model of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 69:2426–2433.
233. Boix V, Fedorak RN, Mullane KM, Pesant Y, Stoutenburgh U, Jin M, Adedoyin A, Chesnel L, Guris D, Larson KB, Murata Y. 2017. Primary outcomes from a phase 3, randomized, double-blind, active-controlled trial of surotomycin in subjects with *Clostridium difficile* infection. *Open Forum Infect Dis* 4:ofw275.
234. Daley P, Louie T, Lutz JE, Khanna S, Stoutenburgh U, Jin M, Adedoyin A, Chesnel L, Guris D, Larson KB, Murata Y. 2017. Surotomycin versus vancomycin in adults with *Clostridium difficile* infection: primary clinical outcomes from the second pivotal, randomized, double-blind, Phase 3 trial. *J Antimicrob Chemother* 72:3462–3470.
235. Bassères E, Endres BT, Khaleduzzaman M, Miraftabi F, Alam MJ, Vickers RJ, Garey KW. 2016. Impact on toxin production and cell morphology in *Clostridium difficile* by ridinilazole (SMT19969), a novel treatment for *C. difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 71:1245–1251.
236. Baines SD, Crowther GS, Freeman J, Todhunter S, Vickers R, Wilcox MH. 2015. SMT19969 as a treatment for *Clostridium*

- difficile* infection: an assessment of antimicrobial activity using conventional susceptibility testing and an in vitro gut model. J Antimicrob Chemother 70:182–189.
237. Vickers RJ, Tillotson GS, Nathan R, Hazan S, Pullman J, Lucasti C, Deck K, Yacyshyn B, Maliakkal B, Pesant Y, Tejura B, Roblin D, Gerding DN, Wilcox MH, CoDiFY study group. 2017. Efficacy and safety of ridinilazole compared with vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a phase 2, randomised, double-blind, active-controlled, non-inferiority study. Lancet Infect Dis 17:735–744.
  238. Khanna S, Gerding DN. 2019. Current and future trends in *Clostridioides (clostridium) difficile* infection management. Anaerobe.
  239. Riley TV, Lyras D, Douce GR. 2019. Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*. Vaccine.
  240. Cammarota G, Gallo A, Ianaro G, Montalto M. 2019. Emerging drugs for the treatment of *Clostridium difficile*. Expert Opin Emerg Drugs 24:17–28.
  241. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 353:2433–2441.
  242. Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I. 2007. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect 13:1048–1057.
  243. Soler P, Nogareda F, Cano R. 2008. Rates of *Clostridium difficile* infection in patients discharged from Spanish hospitals, 1997–2005. Infect Control Hosp Epidemiol 29:887–889.
  244. Lyytikäinen O, Turunen H, Sund R, Räsänen M, Könönen E, Ruutu P, Keskimäki I. 2009. Hospitalizations and deaths associated with *Clostridium difficile* infection, Finland, 1996–2004. Emerg Infect Dis 15:761–765.
  245. Sørensen L, Mølbak K, Strøbaek S, Truelsen Jensen K, Torpdahl M, Persson S, Kemp M, Olsen KE. 2009. The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Denmark--a possible link with the increased consumption of fluoroquinolones and cephalosporins? Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 14.
  246. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmée M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, von Müller L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Norén T, Nováková E, Nyč O, Rupnik M, Schmid D, Wilcox MH. 2014. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect Dis 14:1208–1219.
  247. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM, Burns DA, Davis GL, Wilcox MH, on behalf of the EUCLID study group. 2016. Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. Eurosurveillance 21.
  248. Lachowicz D, Szulencka G, Obuch-Woszczatyński P, van Belkum A, Pituch H. 2015. First Polish outbreak of *Clostridium difficile* ribotype 027 infections among dialysis patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 34:63–67.
  249. van Beurden YH, Dekkers OM, Bomers MK, Kaiser AM, van Houdt R, Knetsch CW, Girbes ARJ, Mulder CJJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE. 2016. An outbreak of *Clostridium difficile* ribotype 027 associated with length of stay in the intensive care unit and use of selective decontamination of the digestive tract: A Case control study. PLOS ONE 11:e0160778.
  250. Bouza E, Alcalá L, Marín M, Valerio M, Reigadas E, Muñoz P, González-Del Vecchio M, de Egea V. 2017. An outbreak of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Spain: risk factors for recurrence and a novel treatment strategy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol 36:1777–1786.
  251. Santos A, Isidro J, Silva C, Boaventura L, Diogo J, Faustino A, Toscano C, Oleastro M. 2016. Molecular and epidemiologic study of *Clostridium difficile* reveals unusual heterogeneity in clinical strains circulating in different regions in Portugal. Clin Microbiol Infect 22:695–700.

252. Baldan R, Trovato A, Bianchini V, Biancardi A, Cichero P, Mazzotti M, Nizzero P, Moro M, Ossi C, Scarpellini P, Cirillo DM. 2015. *Clostridium difficile* PCR ribotype 018, a successful epidemic genotype. J Clin Microbiol 53:2575–2580.
253. Berger FK, Gfrörer S, Becker SL, Baldan R, Cirillo DM, Frentrop M, Steglich M, Engling P, Nübel U, Mellmann A, Bischoff M, Gärtner B, von Müller L. 2019. Hospital outbreak due to *Clostridium difficile* ribotype 018 (RT018) in southern Germany. Int J Med Microbiol.
254. Cairns MD, Preston MD, Lawley TD, Clark TG, Stabler RA, Wren BW. 2015. Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak Caused by a toxin A-negative *Clostridium difficile* sublineage PCR ribotype 017 strain in London, England. J Clin Microbiol 53:3141–3147.
255. Crobach MJT, Voor in 't holt AF, Knetsch CW, van Dorp SM, Bras W, Harmanus C, Kuijper EJ, Vos MC. 2017. An outbreak of *Clostridium difficile* infections due to new PCR ribotype 826: epidemiologic and microbiologic analyses. Clin Microbiol Infect.
256. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, Roberts T, Croyle K, Krystofiak S, Patel-Brown S, Pasculle AW, Paterson DL, Saul M, Harrison LH. 2005. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. Infect Control Hosp Epidemiol 26:273–280.
257. Rupnik M, Avesani V, Janc M, von Eichel-Streiber C, Delmée M. 1998. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. J Clin Microbiol 36:2240–2247.
258. Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, Parashar UD, Lopman BA. 2012. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999–2007. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 55:216–223.
259. Lessa FC, Winston LG, McDonald LC, Emerging Infections Program C. difficile Surveillance Team. 2015. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. N Engl J Med 372:2369–2370.
260. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK, Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team. 2014. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med 370:1198–1208.
261. Salazar CL, Reyes C, Atehortua S, Sierra P, Correa MM, Paredes-Sabja D, Best E, Fawley WN, Wilcox M, González Á. 2017. Molecular, microbiological and clinical characterization of *Clostridium difficile* isolates from tertiary care hospitals in Colombia. PLoS ONE 12.
262. Quesada-Gómez C, Rodríguez C, Gamboa-Coronado M del M, Rodríguez-Cavallini E, Du T, Mulvey MR, Villalobos-Zúñiga M, Boza-Cordero R. 2010. Emergence of *Clostridium difficile* NAP1 in Latin America. J Clin Microbiol 48:669–670.
263. Quesada-Gómez C, López-Ureña D, Acuña-Amador L, Villalobos-Zúñiga M, Du T, Freire R, Guzmán-Verri C, Gamboa-Coronado M del M, Lawley TD, Moreno E, Mulvey MR, Brito GA de C, Rodríguez-Cavallini E, Rodríguez C, Chaves-Olarte E. 2015. Emergence of an outbreak-associated *Clostridium difficile* variant with increased virulence. J Clin Microbiol 53:1216–1226.
264. López-Ureña D, Quesada-Gómez C, Miranda E, Fonseca M, Rodríguez-Cavallini E. 2014. Spread of epidemic *Clostridium difficile* NAP1/027 in Latin America: case reports in Panama. J Med Microbiol 63:322–324.
265. Camacho-Ortiz A, López-Barrera D, Hernández-García R, Galván-De los Santos AM, Flores-Treviño SM, Llaca-Díaz JM, Garza HJM, Bosques-Padilla FJ, Garza-González E. 2015. First report of *Clostridium difficile* NAP1/027 in a mexican hospital. PLOS ONE 10:e0122627.
266. Hernández-Rocha C, Barra-Carrasco J, Pizarro-Guajardo M, Ibáñez P, Bueno SM, Sarker MR, Guzman AM, Alvarez-Lobos M, Paredes-Sabja D. 2012. Epidemic *Clostridium difficile* ribotype 027 in Chile. Emerg Infect Dis 18:1370–1372.
267. Borren NZ, Ghadermarzi S, Hutfless S, Ananthakrishnan AN. 2017. The emergence of *Clostridium difficile* infection in Asia: A

- systematic review and meta-analysis of incidence and impact. *PloS One* 12:e0176797.
268. Imwattana K, Knight DR, Kullin B, Collins DA, Putsathit P, Kiratisin P, Riley TV. 2019. *Clostridium difficile* ribotype 017 - characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia. *Emerg Microbes Infect* 8:796–807.
  269. Kato H, Kato N, Watanabe K, Yamamoto T, Suzuki K, Ishigo S, Kunihiro S, Nakamura I, Killgore GE, Nakamura S. 2001. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. *J Clin Microbiol* 39:1391–1395.
  270. Huang H, Fang H, Weintraub A, Nord CE. 2009. Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in *Clostridium difficile* from Shanghai and Stockholm. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 15:1170–1173.
  271. Kim H, Jeong SH, Roh KH, Hong SG, Kim JW, Shin M-G, Kim M-N, Shin HB, Uh Y, Lee H, Lee K. 2010. Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of *Clostridium difficile* isolated from 12 hospitals in South Korea. *Korean J Lab Med* 30:491–497.
  272. Chia J-H, Lai H-C, Su L-H, Kuo A-J, Wu T-L. 2013. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* at a medical center in Taiwan: persistence of genetically clustering of A-B<sup>+</sup> isolates and increase of A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> isolates. *PloS One* 8:e75471.
  273. Riley TV, Thean S, Hool G, Golledge CL. 2009. First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027. *Med J Aust* 190:706–708.
  274. Richards M, Knox J, Elliott B, Mackin K, Lyras D, Waring LJ, Riley TV. 2011. Severe infection with *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 acquired in Melbourne, Australia. *Med J Aust* 194:369–371.
  275. Foster NF, Collins DA, Ditchburn SL, Duncan CN, van Schalkwyk JW, Golledge CL, Keed ABR, Riley TV. 2014. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in two tertiary-care hospitals in Perth, Western Australia: a cross-sectional study. *New Microbes New Infect* 2:64–71.
  276. Furuya-Kanamori L, Riley TV, Paterson DL, Foster NF, Huber CA, Hong S, Harris-Brown T, Robson J, Clements AC. 2017. Comparison of *Clostridium difficile* ribotypes circulating in Australian hospitals and communities. *J Clin Microbiol* 55:216–225.
  277. Lim SK, Stuart RL, Mackin KE, Carter GP, Kotsanas D, Francis MJ, Easton M, Dimovski K, Elliott B, Riley TV, Hogg G, Paul E, Korman TM, Seemann T, Stinear TP, Lyras D, Jenkin GA. 2014. Emergence of a ribotype 244 strain of *Clostridium difficile* associated with severe disease and related to the epidemic ribotype 027 strain. *Clin Infect Dis* 58:1723–1730.
  278. Kullin BR, Reid S, Abratt V. 2018. *Clostridium difficile* in patients attending tuberculosis hospitals in Cape Town, South Africa, 2014–2015. *Afr J Lab Med* 7:846.
  279. Onwueme K, Fadairo Y, Idoko L, Onuh J, Alao O, Agaba P, Lawson L, Ukomadu C, Idoko J. 2011. High prevalence of toxinogenic *Clostridium difficile* in Nigerian adult HIV patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105:667–669.
  280. Simango C, Uladi S. 2014. Detection of *Clostridium difficile* diarrhoea in Harare, Zimbabwe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 108:354–357.
  281. Seugendo M, Mshana SE, Hokororo A, Okamo B, Mirambo MM, von Müller L, Gunka K, Zimmermann O, Groß U. 2015. *Clostridium difficile* infections among adults and children in Mwanza/Tanzania: is it an underappreciated pathogen among immunocompromised patients in sub-Saharan Africa? *New Microbes New Infect* 8:99–102.
  282. Asensio A, Monge D. 2012. Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica* 30:333–337.
  283. Asensio A, Vaque-Rafart J, Calbo-Torrecillas F, Gestal-Otero JJ, López-Fernández F, Trilla-García A, Canton R, EPINE Working Group. 2008. Increasing rates in *Clostridium difficile* infection (CDI) among hospitalised patients, Spain 1999–2007. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 13.
  284. Alcalá L, Marín M, Martín A, Sánchez-Somolinos M, Catalán P, Peláez MT, Bouza E. 2011. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection in Spain: a population-based survey. *J Hosp Infect* 79:13–17.

285. Alcalá L, Martín A, Marín M, Sánchez-Somolinos M, Catalán P, Peláez T, Bouza E. 2012. The undiagnosed cases of *Clostridium difficile* infection in a whole nation: where is the problem? Clin Microbiol Infect 18:E204–E213.
286. Gutiérrez-Pizarra A, Martín-Villén L, Alcalá-Hernández L, Marín Arriaza M, Balandín-Moreno B, Aragón-González C, Ferreres-Franco J, Chiveli Monleón MÁ, Anguita-Alonso P, Bouza-Santiago E, Garnacho-Montero J. 2018. Epidemiology and risk factors for *Clostridium difficile* infection in critically ill patients in Spain: The PROCRID study. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica 36:218–221.
287. Bouza E, Martín A, Van den Berg RJ, Kuijper EJ. 2008. Laboratory-acquired *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027: a new risk for laboratory workers? Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 47:1493–1494.
288. Muñoz-Vélez M, García-Bujalance S. 2014. [*Clostridium difficile* infection due to ribotype 027: description of an imported case in Spain]. Enferm Infecc Microbiol Clin 32:542–543.
289. Arca-Suárez J, Galán-Sánchez F, Cano-Cano F, García-Santos G, Rodríguez-Iglesias MA. 2018. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of toxigenic clinical isolates of *Clostridium difficile* causing infections in the south of Spain. Anaerobe 54:146–150.
290. Suárez-Bode L, Barrón R, Pérez JL, Mena A. 2019. Increasing prevalence of the epidemic ribotype 106 in healthcare facility-associated and community-associated *Clostridioides difficile* infection. Anaerobe 55:124–129.
291. Aroca-Ferri M. 2019. Primer brote de *Clostridium difficile* ribotipo 027 en Canarias. Abstract 0767. XXIII Congreso Nacional Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
292. Gómez De Frutos. 2019. Estudio de la infección por *Clostridium difficile* ribotipo 027 en un hospital universitario entre 2016 y 2018. Abstract 0766. XXIII Congreso Nacional Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
293. Fernández-Blázquez A. 2019. Caracterización molecular de aislados de *Clostridium difficile* toxigénico en Asturias. Abstract 0769. XXIII Congreso Nacional Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
294. Tschudin-Sutter S, Kuijper EJ, Durovic A, Vehreschild MJGT, Barbut F, Eckert C, Fitzpatrick F, Hell M, Norén T, O'Driscoll J, Coia J, Gastmeier P, von Müller L, Wilcox MH, Widmer AF, Allerberger F, Cornely OA, Delmée M, Olesen B, van Broeck J. 2018. Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings. Clin Microbiol Infect.
295. Koll BS, Ruiz RE, Calfee DP, Jalon HS, Stricof RL, Adams A, Smith BA, Shin G, Gase K, Woods MK, Sirtalan I. 2014. Prevention of hospital-onset *Clostridium difficile* infection in the New York metropolitan region using a collaborative intervention model: J Healthc Qual 36:35–45.
296. Dubberke ER, Carling P, Carrico R, Donskey CJ, Loo VG, McDonald LC, Maragakis LL, Sandora TJ, Weber DJ, Yokoe DS, Gerding DN. 2014. Strategies to prevent *Clostridium difficile* infections in acute care hospitals: 2014 Update. Infect Control Hosp Epidemiol 35:628–645.
297. Jury LA, Guerrero DM, Burant CJ, Cadnum JL, Donskey CJ. 2011. Effectiveness of routine patient bathing to decrease the burden of spores on the skin of patients with *Clostridium difficile* infection. Infect Control Hosp Epidemiol 32:181–184.
298. Kundrapu S, Sunkesula V, Sitzlar BM, Fertelli D, Deshpande A, Donskey CJ. 2014. More cleaning, less screening: evaluation of the time required for monitoring versus performing environmental cleaning. Infect Control Hosp Epidemiol 35:202–204.
299. McMullen KM, Zack J, Coopersmith CM, Kollef M, Dubberke E, Warren DK. 2007. Use of hypochlorite solution to decrease rates of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Infect Control Hosp Epidemiol 28:205–207.
300. Vonberg R-P, Kuijper EJ, Wilcox MH, Barbut F, Tüll P, Gastmeier P, van den Broek PJ, Colville A, Coignard B, Daha T, Debast S, Duerden BI, van den Hof S, van der Kooi T, Maarleveld HJH, Nagy E, Notermans DW, O'Driscoll J, Patel B, Stone S, Wiuff C. 2008. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 14:2–20.
301. Durovic A, Widmer A, Tschudin Sutter S. 2018. New insights into transmission of

- Clostridium difficile* infection - a narrative review. Clin Microbiol Infect.
302. Dingle KE, Didelot X, Quan TP, Eyre DW, Stoesser N, Golubchik T, Harding RM, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, Finney JM, Wyllie DH, Oakley SJ, Fawley WN, Freeman J, Morris K, Martin J, Howard P, Gorbach S, Goldstein EJC, Citron DM, Hopkins S, Hope R, Johnson AP, Wilcox MH, Peto TEA, Walker AS, Crook DW. 2017. Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. Lancet Infect Dis.
  303. Lawes T, Lopez-Lozano J-M, Nebot CA, Macartney G, Subbarao-Sharma R, Wares KD, Sinclair C, Gould IM. 2017. Effect of a national 4C antibiotic stewardship intervention on the clinical and molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infections in a region of Scotland: a non-linear time-series analysis. Lancet Infect Dis 17:194–206.
  304. Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP. 2008. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 14:1057–1064.
  305. Spigaglia P, Mastrantonio P. 2002. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. J Clin Microbiol 40:3470–3475.
  306. Persson S, Jensen JN, Olsen KEP. 2011. Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and internal in-frame deletion of tcdC. J Clin Microbiol 49:4299–4300.
  307. Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 26:2465–2466.
  308. Steglich M, Hofmann JD, Helmecke J, Sikorski J, Spröer C, Riedel T, Bunk B, Overmann J, Neumann-Schaal M, Nübel U. 2018. Convergent loss of ABC transporter genes from *Clostridioides difficile* genomes is associated with impaired tyrosine uptake and p-Cresol production. Front Microbiol 9:901.
  309. Li H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:13033997.
  310. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK. 2012. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. Genome Res 22:568–576.
  311. Didelot X, Wilson DJ. 2015. ClonalFrameML: efficient inference of recombination in whole bacterial genomes. PLoS Comput Biol 11:e1004041.
  312. Eyre DW, Fawley WN, Rajgopal A, Settle C, Mortimer K, Goldenberg SD, Dawson S, Crook DW, Peto TEA, Walker AS, Wilcox MH. 2017. Comparison of control of *Clostridium difficile* infection in six english hospitals using whole-genome sequencing. Clin Infect Dis 65:433–441.
  313. Krutova M, Wilcox M, Kuijper E. 2018. The pitfalls of laboratory diagnostics of *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect.
  314. Sandlund J, Bartolome A, Almazan A, Tam S, Bischocho S, Abusali S, Bishop JJ, Nolan N, Estis J, Todd J, Young S, Senchyna F, Banaei N. 2018. Ultrasensitive detection of *Clostridioides difficile* toxins A and B by use of automated single-molecule counting technology. J Clin Microbiol 56.
  315. Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, Leslie JL, Chin DL, Wang S, Nguyen HH, Huang B, Tang Y-W, Lee LW, Kim K, Taylor S, Romano PS, Panacek EA, Goodell PB, Solnick JV, Cohen SH. 2015. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* infection in the molecular test era. JAMA Intern Med 175:1792.
  316. Sumon ZE, Lesse AJ, Sellick JA, Tetewsky S, Mergenhausen KA. 2019. Temporal trends of inpatient *Clostridium difficile* infections within the Veterans Health Administration hospitals: An analysis of the effect of molecular testing, time to testing, and mandatory reporting. Infect Control Hosp Epidemiol 1–8.
  317. Kotila SM, Mentula S, Ollgren J, Virolainen-Julkunen A, Lyytikäinen O. 2016. Community- and healthcare-associated *Clostridium difficile* infections, Finland, 2008–2013(1). Emerg Infect Dis 22:1747–1753.



318. ECDC. 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. European Surveillance of *Clostridium difficile* infections. Surveillance protocol version 2.3. Stockholm: ECDC; 2017.
319. Fekety R, McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Mulligan ME. 1997. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea: characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 24:324–333.
320. Pepin J, Alary M-E, Valiquette L, Raiche E, Ruel J, Fulop K, Godin D, Bourassa C. 2005. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 40:1591–1597.
321. Eyre DW, Walker AS, Wyllie D, Dingle KE, Griffiths D, Finney J, O'Connor L, Vaughan A, Crook DW, Wilcox MH, Peto TEA, Infections in Oxfordshire Research Database. 2012. Predictors of first recurrence of *Clostridium difficile* infection: implications for initial management. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 55 Suppl 2:S77-87.
322. Wilcox MH, Fawley WN, Settle CD, Davidson A. 1998. Recurrence of symptoms in *Clostridium difficile* infection--relapse or reinfection? J Hosp Infect 38:93–100.
323. Gómez S, Chaves F, Orellana MA. 2017. Clinical, epidemiological and microbiological characteristics of relapse and re-infection in *Clostridium difficile* infection. Anaerobe 48:147–151.
324. Marsh JW, Arora R, Schlackman JL, Shutt KA, Curry SR, Harrison LH. 2012. Association of relapse of *Clostridium difficile* disease with BI/NAP1/027. J Clin Microbiol 50:4078–4082.
325. Kim J, Seo M-R, Kang JO, Kim Y, Hong S-P, Pai H. 2014. Clinical characteristics of relapses and re-infections in *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 20:1198–1204.
326. Kamboj M, Khosa P, Kaltsas A, Babady NE, Son C, Sepkowitz KA. 2011. Relapse versus reinfection: surveillance of *Clostridium difficile* infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 53:1003–1006.
327. Eyre DW, Davies KA, Davis G, Fawley WN, Dingle KE, De Maio N, Karas A, Crook DW, Peto TEA, Walker AS, Wilcox MH, EUCLID Study Group, Davies KA, Wilcox MH, Davis G, Longshaw CM, Kuijper E, von Muller L, Lyytikäinen O, Mentula S, Fitzpatrick F, Bouza E, Barbut F, Oleastro M, Delmee M, Mastrantonio P, Noren T, Allerberger F, Pituch H, Rupnik M, Barna Z, Petinaki E, Nyč O, Lemeni D, Ivanova K, Novakova E. 2018. Two distinct patterns of *Clostridium difficile* diversity across Europe indicating contrasting routes of spread. Clin Infect Dis 67:1035–1044.
328. Krutova M, Matejkova J, Kuijper EJ, Drevinek P, Nyc O, Czech *Clostridium difficile* study group. 2016. *Clostridium difficile* PCR ribotypes 001 and 176 - the common denominator of *C. difficile* infection epidemiology in the Czech Republic, 2014. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 21.
329. Rupnik M, Tambic Andrasevic A, Trajkovska Dokic E, Matas I, Jovanovic M, Pasic S, Kocuvan A, Janezic S. 2016. Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes and high proportion of 027 and 176 in some hospitals in four South Eastern European countries. Anaerobe 42:142–144.
330. Colomb-Cotinat M, Assouvie L, Durand J, Daniau C, Leon L, Maugat S, Soing-Altrach S, Gateau C, Couturier J, Arnaud I, Astagneau P, Berger-Carbonne A, Barbut F. 2019. Epidemiology of *Clostridioides difficile* infections, France, 2010 to 2017. Eurosurveillance 24.
331. Popescu GA, Florea D, Rafila A. 2014. *Clostridium difficile* is emerging in Romania: a story of 027 ribotype and excessive antibiotic consumption. J Gastrointest Liver Dis JGLD 23:342–343.
332. Popescu GA, Serban R, Pistol A, Niculcea A, Preda A, Lemeni D, Macovei IS, Tălăpan D, Rafila A, Florea D. 2018. The Recent emergence of *Clostridium difficile* infection in romanian hospitals is associated with a high prevalence of polymerase chain reaction ribotype 027. Balk Med J 35:191–195.
333. Ofori E, Ramai D, Dhawan M, Mustafa F, Gasperino J, Reddy M. 2018. Community-acquired *Clostridium difficile*: epidemiology, ribotype, risk factors, hospital and intensive care unit outcomes, and current and emerging therapies. J Hosp Infect 99:436–442.
334. Barbut F, Gariazzo B, Bonné L, Lalande V, Burghoffer B, Luiuz R, Petit J-C. 2007. Clinical

- features of *Clostridium difficile*-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:131-139.
335. Brazier JS, Raybould R, Patel B, Duckworth G, Pearson A, Charlett A, Duerden BI, HPA Regional Microbiology Network. 2008. Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007-08. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 13.
336. Labbé A-C, Poirier L, Maccannell D, Louie T, Savoie M, Béliveau C, Laverdière M, Pépin J. 2008. *Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3180-3187.
337. Zaiss NH, Witte W, Nübel U. 2010. Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerg Infect Dis* 16:675-677.
338. Dingle KE, Didelot X, Quan TP, Eyre DW, Stoesser N, Marwick CA, Coia J, Brown D, Buchanan S, Ijaz UZ, Goswami C, Douce G, Fawley WN, Wilcox MH, Peto TEA, Walker AS, Crook DW. 2019. A role for tetracycline selection in recent evolution of agriculture-associated *Clostridium difficile* PCR ribotype 078. *mBio* 10.
339. Muto CA. 2007. Asymptomatic *Clostridium difficile* Colonization: Is This the Tip of Another Iceberg? *Clin Infect Dis* 45:999-1000.
340. Tarrant J, Jenkins RO, Laird KT. 2018. From ward to washer: The survival of *Clostridium difficile* spores on hospital bed sheets through a commercial UK NHS healthcare laundry process. *Infect Control Hosp Epidemiol* 39:1406-1411.
341. Murray SG, Yim JWL, Croci R, Rajkomar A, Schmajuk G, Khanna R, Cucina RJ. 2017. Using spatial and temporal mapping to identify nosocomial disease transmission of *Clostridium difficile*. *JAMA Intern Med* 177:1863-1865.
342. Jencson AL, Cadnum JL, Wilson BM, Donskey CJ. 2019. Spores on wheels: Wheelchairs are a potential vector for dissemination of pathogens in healthcare facilities. *Am J Infect Control* 47:459-461.
343. McDonald EG, Dendukuri N, Frenette C, Lee TC. 2019. Time-Series analysis of health care-associated infections in a new hospital with all private rooms. *JAMA Intern Med*.
344. Zacharioudakis IM, Zervou FN, Pliakos EE, Ziakas PD, Mylonakis E. 2015. Colonization with toxinogenic *Clostridium difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 110:381-390; quiz 391.
345. Donskey CJ, Sunkesula VCK, Stone ND, Gould CV, McDonald LC, Samore M, Mayer J, Pacheco SM, Jencson AL, Sambol SP, Petrella LA, Gulvik CA, Gerding DN. 2018. Transmission of *Clostridium difficile* from asymptotically colonized or infected long-term care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol* 39:909-916.
346. Longtin Y, Paquet-Bolduc B, Gilca R, Garenc C, Fortin E, Longtin J, Trottier S, Gervais P, Roussy J-F, Lévesque S, Ben-David D, Cloutier I, Loo VG. 2016. Effect of detecting and isolating *Clostridium difficile* carriers at hospital admission on the incidence of *C. difficile* Infections: A Quasi-Experimental Controlled Study. *JAMA Intern Med* 176:796-804.
347. Barbanti F, Spigaglia P. 2016. Characterization of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 018: A problematic emerging type. *Anaerobe* 42:123-129.
348. Gateau C, Deboscker S, Couturier J, Vogel T, Schmitt E, Muller J, Ménard C, Turcan B, Zaidi RS, Youssouf A, Lavigne T, Barbut F. 2019. Local outbreak of *Clostridioides difficile* PCR-Ribotype 018 investigated by multi locus variable number tandem repeat analysis, whole genome multi locus sequence typing and core genome single nucleotide polymorphism typing. *Anaerobe* 102087.
349. Wakamatsu Y, Kato H, Miyajima F, Tajima H, Kawada M, Morita S, Roberts P, Hori Y, Kato H, Abe Y, Takahashi M, Niikawa A, Senoh M, Hara T, Miki H, Ueda A, Satomura H, Nakajima T, Sato Y, Fukuda T, Takeuchi H, Shibayama K, Tominaga H, Tanada A, Ito Y, Higuchi A, Toyokawa M, Furuta K, Hagiya H. 2015. Predominance of PCR-ribotypes, 018 (smz) and 369 (trf) of *Clostridium difficile* in Japan: a potential relationship with other global circulating strains? *J Med Microbiol* 64:1226-1236.

350. Kim J, Kim Y, Pai H. 2016. Clinical characteristics and treatment outcomes of *Clostridium difficile* infections by PCR ribotype 017 and 018 Strains. PLOS ONE 11:e0168849.
351. Kao D, Roach B, Silva M, Beck P, Rioux K, Kaplan GG, Chang H-J, Coward S, Goodman KJ, Xu H, Madsen K, Mason A, Wong GK-S, Jovel J, Patterson J, Louie T. 2017. Effect of oral capsule- vs colonoscopy-delivered fecal microbiota transplantation on recurrent *Clostridium difficile* infection: A randomized clinical trial. JAMA 318:1985–1993.
352. Hui W, Li T, Liu W, Zhou C, Gao F. 2019. Fecal microbiota transplantation for treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection: An updated randomized controlled trial meta-analysis. PloS One 14:e0210016.
353. Tariq R, Pardi DS, Bartlett MG, Khanna S. 2019. Low cure rates in controlled trials of fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection: A systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 68:1351–1358.
354. Khan MY, Dirweesh A, Khurshid T, Siddiqui WJ. 2018. Comparing fecal microbiota transplantation to standard-of-care treatment for recurrent *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. Eur J Gastroenterol Hepatol 30:1309–1317.
355. Goldenberg SD, Batra R, Beales I, Digby-Bell JL, Irving PM, Kellingray L, Narbad A, Franslem-Elumogo N. 2018. Comparison of different strategies for providing fecal microbiota transplantation to treat patients with recurrent *Clostridium difficile* infection in two english hospitals: A review. Infect Dis Ther 7:71–86.
356. Maida M, Mcilroy J, Ianiro G, Cammarota G. 2018. Faecal microbiota transplantation as emerging treatment in european countries. Adv Exp Med Biol 1050:177–195.
357. Holleran G, Scaldaferri F, Ianiro G, Lopetuso L, Mc Namara D, Mele MC, Gasbarrini A, Cammarota G. 2018. Fecal microbiota transplantation for the treatment of patients with ulcerative colitis and other gastrointestinal conditions beyond *Clostridium difficile* infection: an update. Drugs Today Barc Spain 1998 54:123–136.
358. Mullish BH, Quraishi MN, Segal JP, McCune VL, Baxter M, Marsden GL, Moore DJ, Colville A, Bhala N, Iqbal TH, Settle C, Kontkowski G, Hart AL, Hawkey PM, Goldenberg SD, Williams HRT. 2018. The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. Gut 67:1920–1941.
359. Juul FE, Garborg K, Bretthauer M, Skudal H, Øines MN, Wiig H, Rose Ø, Seip B, Lamont JT, Midtvedt T, Valeur J, Kalager M, Holme Ø, Helsingen L, Løberg M, Adami H-O. 2018. Fecal microbiota transplantation for primary *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 378:2535–2536.
360. López-Sanromán A, Rodríguez de Santiago E, Cobo Reinoso J, Del Campo Moreno R, Foruny Olcina JR, García Fernández S, García García de Paredes A, Aguilera Castro L, Ferre Aracil C, Albillos Martínez A. 2017. Results of the implementation of a multidisciplinary programme of faecal microbiota transplantation by colonoscopy for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. Gastroenterol Hepatol 40:605–614.
361. Allegretti JR, Allegretti AS, Phelps E, Xu H, Kassam Z, Fischer M. 2018. Asymptomatic *Clostridium difficile* carriage rate post-fecal microbiota transplant is low: a prospective clinical and stool assessment. Clin Microbiol Infect 24:780.e1-780.e3.
362. Wang S, Xu M, Wang W, Cao X, Piao M, Khan S, Yan F, Cao H, Wang B. 2016. Systematic Review: Adverse Events of Fecal Microbiota Transplantation. PloS One 11:e0161174.
363. DeFilipp Z, Bloom PP, Torres Soto M, Mansour MK, Sater MRA, Huntley MH, Turbett S, Chung RT, Chen Y-B, Hohmann EL. 2019. Drug-Resistant *Escherichia coli* bacteremia transmitted by fecal microbiota transplant. N Engl J Med.
364. Tacconelli E, Mazzaferri F, de Smet AM, Bragantini D, Eggimann P, Huttner BD, Kuijper EJ, Lucet J-C, Muters NT, Sanguinetti M, Schwaber MJ, Souli M, Torre-Cisneros J, Price JR, Rodríguez-Baño J. 2019. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 25:807–817.

365. Basso PJ, Câmara NOS, Sales-Campos H. 2018. Microbial-based therapies in the treatment of inflammatory bowel disease - An overview of human studies. *Front Pharmacol* 9:1571.
366. El-Salhy M, Mazzawi T. 2018. Fecal microbiota transplantation for managing irritable bowel syndrome. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 12:439–445.
367. Ohara T, Suzutani T. 2018. Efficacy of fecal microbiota transplantation in a patient with chronic intractable constipation. *Clin Case Rep* 6:2029–2032.
368. Shi Y, Dong Y, Huang W, Zhu D, Mao H, Su P. 2016. Fecal microbiota transplantation for ulcerative colitis: A systematic review and meta-analysis. *PloS One* 11:e0157259.
369. Narula N, Kassam Z, Yuan Y, Colombel J-F, Ponsioen C, Reinisch W, Moayyedi P. 2017. Systematic review and meta-analysis: fecal microbiota transplantation for treatment of active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 23:1702–1709.
370. Kang Y, Cai Y. 2017. Gut microbiota and obesity: implications for fecal microbiota transplantation therapy. *Horm Athens Greece* 16:223–234.
371. Kang Y, Cai Y. 2019. Altered Gut Microbiota in HIV Infection: Future perspective of fecal microbiota transplantation Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 35:229–235.
372. Kang D-W, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, Khoruts A, Geis E, Maldonado J, McDonough-Means S, Pollard EL, Roux S, Sadowsky MJ, Lipson KS, Sullivan MB, Caporaso JG, Krajmalnik-Brown R. 2017. Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 5:10.
373. Millan B, Laffin M, Madsen K. 2017. Fecal Microbiota Transplantation: Beyond *Clostridium difficile*. *Curr Infect Dis Rep* 19:31.





# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Whole-genome sequencing reveals nosocomial *Clostridioides difficile* transmission and a previously unsuspected epidemic scenario

Sergio García-Fernández<sup>1,2</sup>, Martinique Frentrop<sup>3</sup>, Matthias Steglich<sup>3,4</sup>, Aitor Gonzaga<sup>3</sup>, Marta Cobo<sup>1</sup>, Nieves López-Fresneña<sup>5</sup>, Javier Cobo<sup>2,6</sup>, María-Isabel Morosini<sup>1,2</sup>, Rafael Cantón<sup>1,2</sup>, Rosa del Campo<sup>1,2</sup> & Ulrich Nübel<sup>3,4,7</sup>

To trace the routes and frequencies of transmission of *Clostridioides difficile* in a tertiary-care hospital in Madrid (Spain), we sequenced the genomes from all *C. difficile* isolates collected over 36 months (2014–2016) that were indistinguishable from any other isolate by PCR ribotyping. From a total of 589 *C. difficile* infection cases, we cultivated and PCR-ribotyped 367 *C. difficile* isolates (62%), of which 265 were genome-sequenced. Based on close relatedness of successively collected isolates ( $\leq 2$  SNPs difference in their genomes), whole-genome sequencing revealed a total of 17 independent, putative transmission clusters, caused by various *C. difficile* strains and each containing 2 to 18 cases, none of which had been detected previously by standard epidemiological surveillance. Proportions of linked isolates varied widely among PCR ribotypes, from 3% (1/36) for ribotype 014/020 to 60% (12/20) for ribotype 027, suggesting differential aptitudes for nosocomial spread. Remarkably, only a minority (17%) of transmission recipients had direct ward contact to their presumed donors and specific *C. difficile* genome types frequently went undetectable for several months before re-emerging later, suggesting reservoirs for the pathogen outside of symptomatic patients. Taken together, our analysis based on genome sequencing suggested considerable within-hospital epidemic spread of *C. difficile*, even though epidemiological data initially had been inconspicuous.

The anaerobic bacterium *Clostridioides difficile* [formerly called *Clostridium difficile*]<sup>1</sup> is the leading cause of antibiotic-associated diarrhoea<sup>2</sup>. Incidence rates of *C. difficile* infection (CDI) among patients in healthcare institutions in Europe range between 0.7 and 28.7/10,000 patient-bed days<sup>3</sup>, and the incidence is similar in the USA<sup>2</sup>. Genotyping of *C. difficile* isolates facilitates the understanding of CDI epidemiology by tracking the emergence and spread of diverse strains. Presently, the most commonly used technique for genotyping *C. difficile* is PCR ribotyping, which charts length variation of spacer sequences in ribosomal RNA operons<sup>4,5</sup>. For example, ribotype 027 represents a *C. difficile* lineage that has caused several large-scale outbreaks in hospitals in North America and Europe since the early 2000s, triggering an increased awareness about CDI incidence and severity<sup>6</sup>. Sporadic cases of ribotype 027 have been recorded in Spain since 2007<sup>7</sup>, but it has only been recently that an outbreak caused by this ribotype was reported<sup>8</sup>.

Compared to PCR ribotyping and other genotyping methods, whole-genome sequencing has provided increased discriminatory power and more detailed insights into patterns of *C. difficile* spread at both, local<sup>9–11</sup> and international scales<sup>12–14</sup>. In hospitals in the UK, only a minority of *C. difficile* isolates from CDI patients were sufficiently closely related to previously collected isolates to make acquisition through transmission from other CDI cases plausible<sup>10</sup>. This result was unexpected, because the majority of CDI cases commonly were considered

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain. <sup>2</sup>Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain. <sup>3</sup>Leibniz Institute DSMZ, Braunschweig, Germany. <sup>4</sup>German Center of Infection Research (DZIF), Braunschweig, Germany. <sup>5</sup>Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. <sup>6</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain. <sup>7</sup>Braunschweig Integrated Center of Systems Biology (BRICS), Technical University, Braunschweig, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to U.N. (email: [ulrich.nuebel@dsmz.de](mailto:ulrich.nuebel@dsmz.de))

healthcare-associated based on surveillance definitions<sup>15</sup>. Apart from CDI patients, however, other potential sources for *C. difficile* spread were not investigated in that paper<sup>10</sup>, including asymptomatic carriers<sup>16–18</sup>, colonized staff, or environmental contamination<sup>19–21</sup>. Furthermore, the epidemiology of CDI may be strain-dependent, as genome sequences from *C. difficile* isolates collected across Europe suggested distinct spreading patterns for different clonal lineages<sup>12</sup>. While some healthcare-associated ribotypes (027, 001) showed region-specific phylogenetic clustering, others (e.g., 078, 014, 020) appeared to spread effectively over longer distances, possibly associated with the food chain and community acquisition<sup>12</sup>.

In this study, we investigated the molecular, genomic epidemiology of *C. difficile* in a tertiary-care hospital in Madrid, Spain. We used PCR ribotyping and whole-genome sequencing of *C. difficile* isolates collected from CDI patients over three years (2014 and 2016), to trace routes and frequencies of transmission and to monitor therapeutic success, including therapy by faecal microbiota transplantation. Based on whole-genome sequencing data, we discovered an epidemic situation, which had not been suspected on the basis of epidemiological data alone.

## Methods

**Study design.** The study was conducted from January 2014 to December 2016 in a 1,100-bed tertiary-care university hospital in Madrid (Spain) providing medical care for approximately 550,000 inhabitants. Stool samples from all patients with diagnosis of diarrhoea caused by *C. difficile* (as described below) during this period were recruited. Information on dates and length of admission, hospitalization wards, and previous admissions was recovered from the Microbiology Department database and from clinical charts. The ethical committee of Ramón y Cajal University Hospital approved the study (no. 266-17) and decided that informed consent from patients was not required, since bacterial isolates were analysed exclusively, in order to investigate and prevent pathogen spread within the hospital. No tissue samples were collected from patients and data were anonymized. All methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

A CDI case was considered when a patient (two years or older) presented compatible clinical symptoms (i.e., two or more unformed stools in <24 h) with a positive laboratory assay for *C. difficile* toxins in stool (see below). A new case in each patient was defined if the CDI episode was the first one for this patient or if it occurred more than eight weeks after a previous episode<sup>22</sup>. The three-step diagnostic algorithm was applied for the detection of toxigenic *C. difficile* in faecal samples based, first, on enzyme immunoassays (EIAs) detecting glutamate dehydrogenase (GDH) (C Diff Quik Chek, Techlab, Blacksburg VA, USA), second, on toxins A/B detection (TOX A/B Quik Chek, Techlab, Blacksburg VA, USA) and, third, on PCR amplification for the *tcdB* gene (BD MAX Cdiff assay, BD Diagnostic, Franklin Lakes, NJ, USA). In addition, untreated stool samples were cultured on *C. difficile* ChromID agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and after 48 h of incubation at 37 °C in anaerobic conditions, suspicious colonies were identified by MALDI-TOF MS (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany). Antimicrobial susceptibilities to metronidazole, moxifloxacin, tigecycline and vancomycin of randomly selected *C. difficile* isolates were tested by using gradient strips (Etest, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's recommendations and applying MIC breakpoints recommended by EUCAST ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)).

For patients diagnosed with CDI, contact precautions were implemented in our hospital since 2013, including the isolation of CDI patients in single rooms with a private bathroom and the use of barrier precautions (i.e., disposable gown and gloves at the entrance). Cleaning procedures included disinfection with hypochlorite (2,500 ppm available chlorine).

**Epidemiological analyses and surveillance definitions.** CDI were classified as: (i) healthcare facility-onset (HO); (ii) community-onset, healthcare facility-associated (CO-HCFA); (iii) community-associated (CA); and (iv) indeterminate, according to published guidelines<sup>22,23</sup>. HO and CO-HCFA cases together were considered healthcare-associated (HA) CDI.

According to our internal protocols, a CDI outbreak is suspected when three or more new cases of CDI occur on the same medical ward within seven days, or two or more cases within seven days on intensive care units. In an outbreak setting, we immediately alert the healthcare personnel working in the affected area and reinforce the infection control measures as described above.

**Toxin gene analysis and PCR ribotyping.** Presence of *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *cdtA* and *cdtB* genes were tested by PCR in all cultured isolates according to previously described protocols<sup>24</sup>. *tcdC* deletions were characterized by Sanger sequencing using an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and BLASTn comparisons to the Nucleotide Collection database at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. PCR ribotypes of all isolates were determined by using a PCR protocol designed by Bidet *et al.*<sup>25</sup>. The size of DNA fragments was determined using an ABI PRISM 3100 Genetic Analyser apparatus and ribotypes were assigned using the Webribo database (<https://webribo.ages.at/>).

**Faecal microbiota transplantation (FMT).** Patients from our hospital with at least three episodes of CDI were selected for FMT, according to internal protocols and following published guidelines<sup>26</sup>. In addition, patients from other institutions were ambulatory admitted to our hospital specifically for FMT. Faecal donors were usually selected among the patient's relatives, and if no donor could be designated, we used anonymous faecal samples from other donors. Donors had to pass a complete analytic and clinical evaluation to be authorized. FMT was performed by colonoscopy, instilling 50 to 100 grams of faeces dissolved in 500 ml H<sub>2</sub>O into the cecum. Carriage of *C. difficile* was checked by microbiological culture from faecal samples collected about one month after FMT.

**Whole genome sequencing.** From each bacterial isolate, genomic DNA was extracted by using the DNeasy Blood & Tissue kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). Illumina sequencing libraries were prepared as described previously<sup>27</sup> and sequenced on an Illumina NextSeq 500 machine using a Mid-Output



	2014	2015	2016	Total
<sup>a</sup> CDI analyses	2,613	3,196	3,526	9,335
Toxin test positive (%)	203 (7.8%)	235 (7.3%)	297 (8.4%)	735 (7.8%)
New Cases	168	193	228	589
Recurrences (%)	22.0%	23.3%	24.6%	23.3%
Age	67.6 (2–95)	68.2 (2–98)	65.7 (2–92)	67.2 (2–98)
Females (%)	64.3%	58.5%	50.4%	57.7%
HO (%)	93 (55.4)	104 (53.9)	110 (48.2)	307 (52.5)
CO-HCFA (%)	35 (20.8)	32 (16.6)	43 (18.9)	110 (18.8)
CA (%)	35 (20.8)	49 (25.4)	63 (27.6)	147 (24.6)
Indeterminate	5 (3.0)	8 (4.1)	12 (5.3)	25 (4.1)
<sup>b</sup> HO rate	3.8	4.3	4.7	4.3
<sup>c</sup> CO-HCFA rate	1.1	1.0	1.3	1.1
HO average length of stay	25.2 (2–120)	21.6 (4–101)	25.1 (3–116)	23.9 (2–116)
HO days from admission to CDI	12.3 (2–68)	10.6 (2–83)	15.8 (2–99)	12.9 (2–99)
CO-HCFA days from discharge to CDI	12.9 (3–30)	15.4 (2–29)	13.5 (2–30)	13.9 (2–30)

**Table 1.** Diagnostic and epidemiological data. <sup>a</sup>Based on a three step algorithm (i.e., glutamate dehydrogenase-EIA plus toxin-EIA, confirmed by toxin-gene PCR). <sup>b</sup>HO as the number of cases per 10,000 patient-days. <sup>c</sup>CO-HCFA as the number of cases per 1,000 patient admissions.

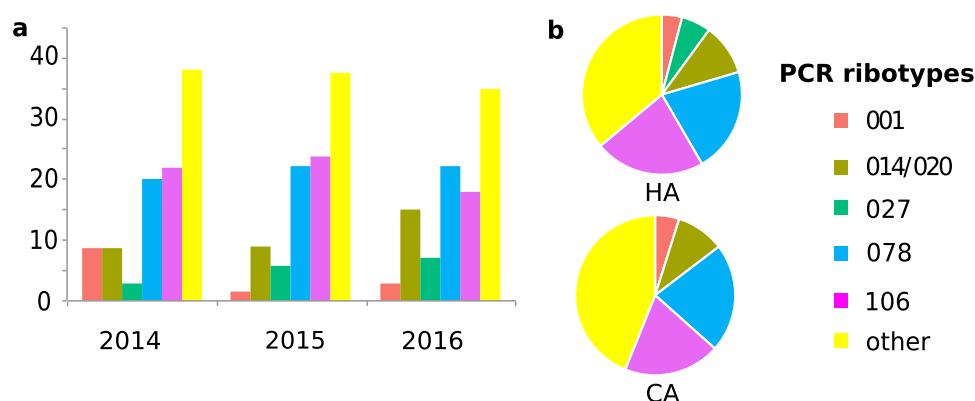
kit (Illumina) with 300 cycles. Sequencing reads were mapped to the reference genome sequence from *C. difficile* strain R20291 (ribotype 027; sequence accession number FN545816, European Nucleotide Archive) by using BWA-MEM<sup>28</sup> (v0.7.12) and sequence variation was detected by applying VarScan2<sup>29</sup> (v2.3) as reported previously<sup>27</sup>. Sequence variation likely generated by recombination was detected through analysis with ClonalFrameML<sup>30</sup> (v1.11) and removed prior to determination of pairwise sequence distances<sup>11</sup> and to construction of maximum-likelihood phylogenetic trees with PhyML, implemented in Seaview 4 (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>). For calculating proportions of putative transmissions among CDI cases, we considered transmission recipients from April 2014 to December 2016 only, excluding a run-in period of three months similar to a recently published protocol<sup>11</sup>, because transmission sources for CDI during the first three months of the study period might have been from 2013 and hence not included in the dataset. All genome sequencing data was submitted to the European Nucleotide Archive ([www.ebi.ac.uk/ena](http://www.ebi.ac.uk/ena)) under study number PRJEB28391.

## Results

**Epidemiology.** During the 36 months of the study, 9,335 faecal samples from diarrhoeic patients were tested for *C. difficile* in our institution (Table 1). A total of 735 of these samples tested *C. difficile* toxin-positive, leading to the identification of 589 new CDI cases, corresponding to 4.3 HO cases per 10,000 patient days (Table 1). Of note, samples from 226 of these CDI cases (45%) had tested positive in GDH-EIA and toxin-PCR assays only, yet were toxin-EIA negative. The majority (72%) of CDI cases were classified as healthcare-associated according to surveillance definitions (53% HO, 19% CO-HCFA), whereas 25% of cases were community-associated and 4% were indeterminate (Table 1)<sup>23</sup>. For HO, a mean period of 12.9 days (range, 2 to 116) passed from admission to the development of CDI, and for CO-HCFA, an average of 13.9 days (range, 2 to 99 days) passed from discharge to CDI (Table 1). Inpatients with HO were admitted in 33 different medical departments in the hospital, and the majority of cases occurred in the departments for Internal Medicine (25%), Gastroenterology (12%), General Surgery (12%), Oncology (7%), and, less frequently, in Traumatology, Nephrology, Haematology, and Infectious Diseases with around 5% of HO cases each (data not shown).

**PCR ribotype diversity.** *Clostridioides difficile* isolates from 367 new CDI cases (62% of 589 CDI cases) were successfully cultivated and PCR-ribotyped. All isolates carried the genes encoding enterotoxins A and B, whereas positive PCR amplification of the binary toxin *cdtA/cdtB* genes was observed in 106 isolates (29%). The 367 isolates were affiliated to 96 different PCR ribotypes, indicating high genetic diversity among our *C. difficile* population. However, the five most prevalent PCR ribotypes accounted for 63% of all isolates, with ribotypes 078 and 106 each causing around 20% of CDI cases throughout the three-year period of the study (Fig. 1). Of note, ribotype 027 had not been detected among 196 *C. difficile* isolates collected in our hospital between 2009 and 2013 (data not shown). During the study period (2014–2016), there was a notable increase of PCR ribotype 027 prevalence with concomitant decrease of ribotype 001 (Fig. 1). Proportions of major ribotypes were similar among HA and CA, except that ribotype 027 was not found among CA (Fig. 1).

**Antimicrobial drug susceptibilities.** Antibiotic susceptibilities were tested in five isolates from each of the major PCR ribotypes (total number of strain tested  $n = 25$ ). Resistance to metronidazole or vancomycin, routinely used for CDI treatment, was not detected, and tigecycline resistant isolates were not observed either (Table 2). In contrast, the majority of tested isolates were resistant to moxifloxacin, except for those affiliated to PCR ribotype 014/020 (Table 2).



**Figure 1.** (a) Distribution of PCR ribotypes during the three years of the study and (b) proportions of PCR ribotypes among HA and CA.

PCR ribotype (n)	Vancomycin		Tigecycline		Metronidazole		Moxifloxacin	
	% S <sup>a</sup>	MIC <sup>b</sup> range	% S	MIC range	% S	MIC range	% S	MIC range
001 (5)	100	0.19–0.5	100	≤0.016–0.023	100	0.064–0.19	20	0.5–>32
014/020 (5)	100	0.25–0.38	100	≤0.016	100	0.032–0.125	100	0.125–0.75
027 (5)	100	0.016–0.5	100	≤0.016–0.023	100	0.125–0.25	0	>32
078 (5)	100	0.25–0.5	100	≤0.016–0.023	100	0.032–0.047	0	>32
106 (5)	100	0.125–0.5	100	≤0.016–0.023	100	0.064–0.125	40	0.5–>32

**Table 2.** Antimicrobial susceptibilities of *C. difficile* isolates. <sup>a</sup>% S, proportion of susceptible isolates (%); <sup>b</sup>MIC, minimum inhibitory concentration (mg/L).

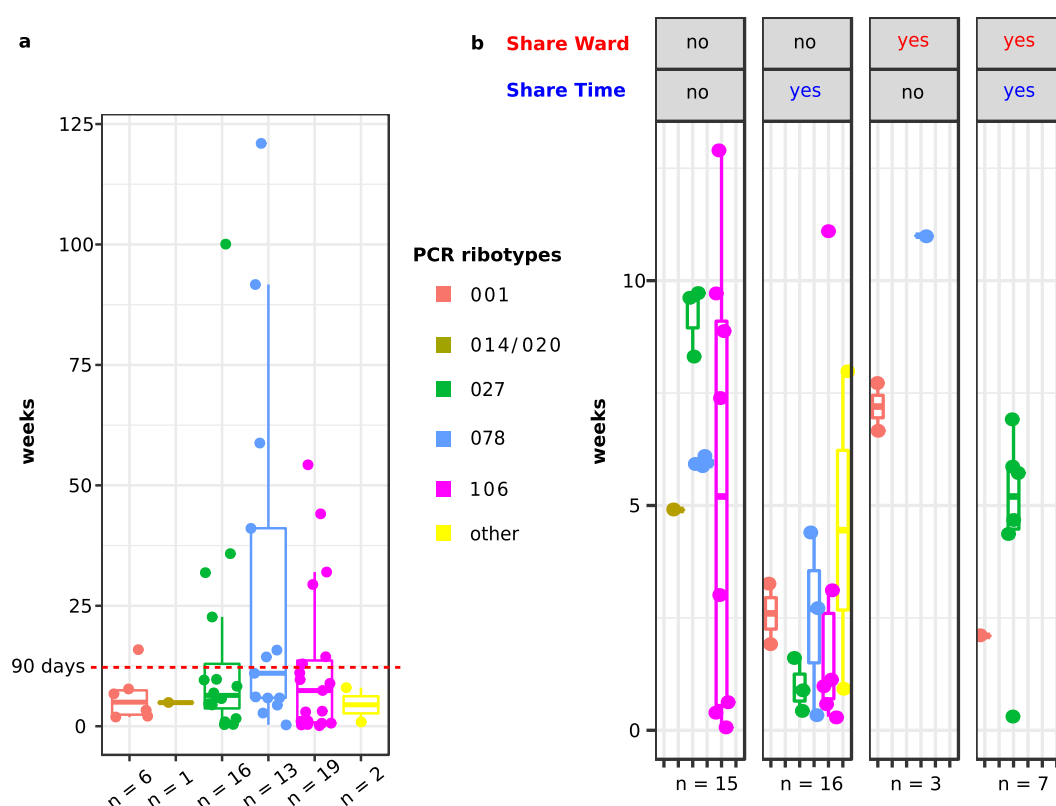
**Genomic relatedness.** We sequenced the genomes from all 265 *C. difficile* isolates affiliated to PCR ribotypes that were represented by at least two isolates. The resulting data provided higher discriminatory power than PCR ribotyping and at the same time enabled analyses of phylogenetic relationships among isolates (Suppl. Figs S1–S6). Recombination-corrected maximum-likelihood phylogenetic trees indicated that subtypes to the canonical PCR ribotypes (provided by the Webribo database on basis of subtle differences in electropherograms) generally did not represent phylogenetically coherent groupings (Suppl. Figs S1–S6). For example, three of four ‘subtypes’ distinguished from ribotype 078 on the basis of single-band differences (078ecdc, 078/1, 078/2, 126) did not cluster phylogenetically but were scattered across the 078 tree (Suppl. Fig. S3). Similarly, isolates with ribotypes 106 and 500, distinguished by a single band in PCR ribotyping, did not cluster in separate phylogenetic clades on the basis of genome sequence variation (Suppl. Fig. S4). For simplicity, in the following we will therefore refer to these two groups of isolates as being affiliated to ribotypes 078 and 106, respectively. Ribotypes 404, 076 and 591, in the genome-based phylogeny all have positions nested within the clade of ribotype 014/020 (Suppl. Fig. S5). Further, genome-based phylogenetic analysis indicated that an isolate displaying a novel PCR ribotype (AI-33) was related to ribotype 027 (Suppl. Fig. S2).

Among 367 *C. difficile* isolates collected April 2014 to December 2016, 41 (11%) were closely related (i.e. displaying ≤2 SNPs difference in their genomes) to other isolates that had been collected in our hospital less than 90 days before (Suppl. Fig. S13). Between these linked CDI cases, direct transmission may be considered plausible, using previously proposed thresholds<sup>11</sup>. Only seven CA cases (8% of 83 that had been ribotyped) yielded isolates that were linked genetically and temporally (i.e., ≤2 SNPs, ≤90 days) to previous isolates from the hospital, suggesting these infections had resulted from transmission in the hospital rather than the community. In contrast, 34 (12%) of 284 isolates from HA cases were linked to previous isolates. Strikingly, proportions of linked isolates varied widely among PCR ribotypes, from 3% for ribotype 014/020 to 60% for ribotype 027 (Table 3). After correcting for incomplete sampling (62%)<sup>11</sup>, the proportion of linked cases was estimated as 19% overall.

Isolates from 21 additional CDI cases were closely related (≤2 SNPs) to previous isolates, yet with time intervals longer than 90 days (Fig. 2A), and in six of these cases, minimum time intervals to close relatives were even longer than one year. Supplementary Figs S7 to S12 illustrate 62 possible transmission events towards CDI patients, considering close genetic relatedness (≤2 SNPs) and the shortest possible time intervals between isolate recovery dates. Altogether 17 putative transmission clusters were detected, each involving two to 18 patients (Suppl. Figs S7 to S12). Remarkably, among the 41 linked cases, only ten pairs of patients (24%) had been admitted on the same ward, and only seven (17%) had been on the same ward during the same time (Fig. 2B). In contrast, 18 (44%) linked cases did not share any time in the hospital with their presumptive sources of transmission, suggesting transmission is common without direct contact between symptomatic patients (Fig. 2B). Specific *C. difficile* genotypes were undetectable in the hospital for extended time periods, before closely related isolates (≤2 SNPs) re-emerged again later (Suppl. Figs S7 to S12). These intervals frequently lasted for several months and in some cases even for more than one year (Suppl. Figs S7 to S10). Interestingly, four patients had stayed in the

PCR Ribotype	<sup>a</sup> Isolates	<sup>b</sup> Putative transmissions
001	15	5 (33%)
014/020	36	1 (3%)
027	20	12 (60%)
078/126	59	7 (12%)
106	59	14 (24%)
446	4	2 (50%)
<sup>c</sup> Other	174	0 (0%)
Total	367	41 (11%)

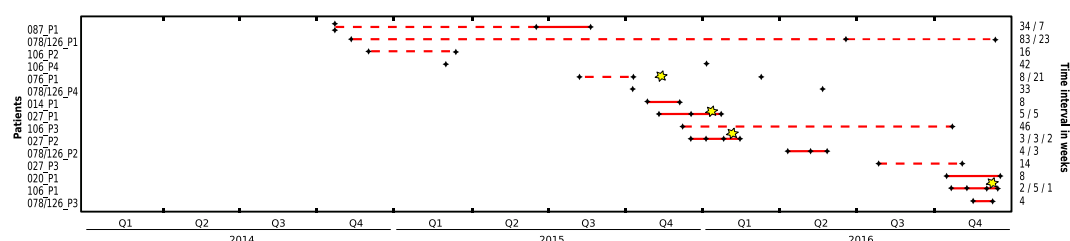
**Table 3.** Proportion of isolates linked to a previous case ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  days) by PCR ribotype, April 2014 to December 2016. <sup>a</sup>One isolate per CDI case. <sup>b</sup>Number of genomes linked to a previous case ( $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  days). <sup>c</sup>Including 102 singletons and the following ribotypes with multiple isolates (number of isolates): 003 (7), 005 (7), 010 (2), 017 (3), 023 (3), 026 (2), 029 (2), 042 (2), 049 (2), 056 (4), 070 (4), 087 (4), 209 (5), 412 (2), 434 (2), 449 (5), 551 (2), 591 (3), 592 (4), 610 (3), AI-78 (2), AI-83 (2).



**Figure 2.** Time intervals between isolates from putative transmission events. Each dot represents one pair of closely related *C. difficile* isolates (i.e.,  $\leq 2$  core-genome SNPs). Horizontal lines indicate the median values, boxes indicate the first and third quartiles, respectively, and vertical lines indicate the maximum and minimum values. Colours indicate the PCR ribotypes. **(a)** 57 putative transmission events. Isolates were linked genetically, but 30% of closely related isolates had been recovered more than 90 days apart. **(b)** Stratification based on information whether CDI patients had stayed at the hospital during the same time or on the same medical ward, respectively. Patients associated with 17% of putative transmission events shared time on the same ward, and patients from 39% of putative transmission events shared time at the hospital, but on separate wards. Only isolates that were linked genetically and temporally (i.e.,  $\leq 2$  SNPs,  $\leq 90$  days) are shown.

exact same bed as their presumed strain donors, with temporal distances between zero and 100 days, pointing at environmental contamination as a potential reservoir for *C. difficile* (Suppl. Figs S1 to S3).

Transmission dynamics were slightly elevated in the Internal Medicine and Gastroenterology wards. While 25% and 12% of HO cases occurred in these two wards, respectively, they accounted for 29% and 17% of the putative transmissions (i.e. 14 and 8 CDI cases on these wards, respectively, were genetically linked to previous cases; Suppl. Figs S7–S13). Further, out of 12 putative transmissions among patients that had been on the same ward, seven occurred on Internal Medicine and three on Gastroenterology wards, respectively. At the same time,



**Figure 3.** Time lines of patients with two or more *C. difficile* isolates. Black diamonds indicate dates of *C. difficile* isolation and yellow stars indicate dates of faecal microbiota transplantation. Connecting lines indicate closely related isolates (i.e.,  $\leq 2$  core-genome SNPs), with solid lines indicating time intervals  $\leq$  eight weeks and dashed lines indicating  $>$  eight weeks.

Internal Medicine had the highest proportion of CDI cases with PCR ribotype 027 (35%) and the highest proportion of HO (25%).

From 15 patients that had two or more episodes of CDI several weeks apart, we included one *C. difficile* isolate from each episode for genome sequencing (Fig. 3). In 13 of these cases, all isolates from separate episodes were closely related ( $\leq 2$  SNPs), demonstrating that those patients had relapses rather than reinfections by another strain. Notably, six (46%) of the presumed relapses had occurred more than eight weeks after the initial episodes (range, 8.1 to 23 weeks), i.e. beyond the currently applied cut-off for surveillance-based detection of CDI relapses<sup>22</sup>.

Three out of four isolates of *C. difficile* recovered from faecal samples one week after FMT were genetically closely related ( $\leq 2$  SNP) to the strains that previously had caused disease (Fig. 3), highlighting the continued colonization of these patients in spite of satisfactory clinical courses.

## Discussion

Among CDI cases that occurred from 2014 to 2016 in a tertiary-care hospital in Madrid, Spain, PCR ribotyping revealed a large diversity of *C. difficile* strains commonly found in European settings<sup>31</sup>. Predominant PCR ribotypes included those typically associated with transmission among patients in healthcare facilities (ribotypes 106, 027, 001), and those thought to have different reservoirs, possibly associated with food or environmental contamination (014/020, 078)<sup>12</sup>. Resistance to metronidazole, vancomycin or tigecycline was not found.

Almost 50% of relapses occurred  $> 8$  weeks after the initial episodes, and similar intervals had been observed in earlier analyses relying on PCR ribotyping<sup>32,33</sup> or multilocus sequence typing<sup>34</sup>, and in one previous genome-based examination<sup>9</sup>. While this data lends support to a change of the standard definition of relapse<sup>32</sup>, the number of patients included (15) was limited, and reinfections with identical strains cannot be ruled out entirely in these cases, since the environment around CDI patients may frequently be contaminated with *C. difficile* spores<sup>35</sup>.

We observed that a high proportion (3/4) of post-FMT patients were still colonized with the disease-causing strain. Even though this observation was based on a very small number of cases ( $n = 4$ ), it may warrant follow-up investigations, since it is in stark contrast to a recent publication which reported that asymptomatic carriage after FMT was very rare (2% after one week, 3% after four weeks)<sup>36</sup>.

Lately, the prevalence of ribotype 027 has been declining in some countries, possibly driven more strongly by a reduction of fluoroquinolone antibiotic usage rather than by improved infection control<sup>37</sup>. In Spain, however, ribotype 027 had been uncommon until 2014, when it caused a large outbreak in a hospital in Madrid<sup>8</sup>. In our hospital, ribotype 027 had not been detected prior to September 2014, yet once it had got introduced, its prevalence increased steadily to 7% of all CDI cases in 2016. Genome sequencing indicated that all 027 isolates except one were extremely closely related, consistent with only two imports of 027 into the hospital. At least 60% of 027 infections were caused by transmission between CDI patients, driving continued persistence and spread within the hospital. Further, it is plausible that the emergence of 027 may have caused the concomitant decrease of 001 prevalence, since both strains are resistant to fluoroquinolones and hence may occupy a similar niche, as observed in other locations in the past<sup>38,39</sup>. However, ribotype 106 is another fluoroquinolone-resistant strain that displayed high prevalence (21%) in our hospital and a healthcare-associated transmission pattern. Ribotype 106 has a more restricted international distribution than the former two strains, yet it was reported from hospitals in Spain before<sup>31</sup>. Ribotypes 027 and 106 each caused large and previously unnoticed outbreaks, protracting over the entire study period and involving 17 and 18 patients, respectively (Suppl. Figs S8, S10).

Ribotypes 014/020 and 078 were also highly prevalent in our hospital, even though there was more limited evidence for within-hospital transmission, particularly for ribotype 014/020. Instead, we observed large phylogenetic diversity among these isolates, consistent with numerous independent introductions to the healthcare facility, presumably by colonized patients. Both these strains are globally distributed and reach high prevalence in many regions, including Spain<sup>40</sup>. While their reservoirs and means of spread are not understood, 078 is frequently found in livestock (fattening pigs, in particular), and it has been speculated this strain may spread internationally via the food chain<sup>12</sup>. In contrast to ribotype 014/020, ribotype 078 is frequently fluoroquinolone resistant<sup>41</sup>.

Taken together, our genomic data provides evidence of frequent within-hospital transmission of healthcare-associated ribotypes (ribotypes 027, 001 and 106), in contrast to those strains commonly found in livestock and among CA (ribotypes 078 and 014/20). These results corroborate recent observations of lineage-specific spreading routes across Europe<sup>12</sup> and further indicate that distinct, associated transmission patterns may also

be observed at a local scale. Naturally, the epidemic processes in our hospital were embedded in a larger setting, such that pathogens may have entered and left the institution in association with patients, and therefore we cannot exclude that outbreaks may have extended beyond our institution. While our hospital recruited numerous patients through transfers from other hospitals during the study period, however, we detected only a single patient suffering an infection with *C. difficile* ribotype 027 in the second half of 2015 (patient 027\_E in Suppl. Fig. S8), who had previously stayed in another hospital in Madrid where an outbreak with the same PCR ribotype had been ongoing at the time<sup>8</sup>. The ribotype 027 isolate from this patient had a genome that was indistinguishable from those of two other isolates in our hospital, suggesting the two outbreaks may indeed have been interrelated. Elucidating these potential connections at greater detail, however, would require inclusion of genome sequences from *C. difficile* isolates from the other hospital.

Strikingly, almost half of the plausible transmission events were predicted between patients that had not shared any time in the hospital. Some of these transmissions might in fact have originated from infected patients that went undetected, either because infections had not been diagnosed due to mild courses of disease or to low sensitivity of the toxin EIA<sup>22</sup>, or because *C. difficile* isolates had not been cultured from these CDI cases. Some *C. difficile* isolates were lost later when they failed to re-grow from frozen stocks or because cultures got contaminated. However, the sampling strategy and recovery rate were uniform throughout the three years of the study (Suppl. Fig. S13), and CDI cases that were not represented among cultivated *C. difficile* isolates were randomly distributed through time. Therefore, the lack of some isolates should not have introduced much bias to our results, and incomplete sampling is unlikely to explain why only 17% of transmission recipients had direct ward contact to their presumed donors. Instead, a significant proportion of transmissions must have occurred either indirectly, e.g. through environmental contamination with *C. difficile* spores, or from reservoirs outside of CDI patients, such as asymptotically colonized patients or staff. Such indirect transmission may also explain the observed long time intervals (i.e. >90 days, with a maximum of 847 days) between isolation dates from a large proportion of presumed sources and recipients. In four extreme cases, CDI patients had occupied the exact same hospital beds as their presumed sources of *C. difficile*, albeit two of them had done so 97 and 100 days apart, respectively. This result provides a hint at environmental contamination as a relevant source for *C. difficile*. *Clostridioides difficile* spores can stay viable and infective in the inanimate environment for long time periods and their efficient inactivation is challenging. While the quantitative contribution of spore intake to hospital-onset CDI has not been assessed, *C. difficile* has frequently been cultured from surfaces in hospital rooms<sup>19</sup>. Moreover, prior room occupancy by a CDI patient was shown to be a risk factor for CDI acquisition by subsequent patients<sup>42</sup>. Due to frequent movements of patients, acquisition of *C. difficile* spores may also occur from contaminated surfaces outside of patient rooms. For example, contact of CDI patients with central diagnostic equipment (i.e., a computed tomography scanner) was recently found to increase the odds of subsequent users to also develop CDI<sup>20</sup>. Consequently, the thoroughness of cleaning both rooms and equipment was recommended to be improved, including repetitive training of cleaning personnel and regular quality control<sup>20,21</sup>. In addition, around 8% of patients may be asymptotically colonized upon hospital admission<sup>43</sup> and they clearly contribute to transmission<sup>44</sup>. Indeed, previous investigations using highly discriminatory molecular typing showed that CDI cases were equally frequently linked to asymptomatic carriers as to previous CDI patients<sup>17,45</sup>. Furthermore, ward-level exposure to asymptomatic carriers in a hospital increased the risk of developing CDI by almost two-fold<sup>16</sup>, and identification of *C. difficile* carriers at hospital admission (by rectal swabbing and toxin-gene PCR) and isolation through contact precautions reduced the overall CDI rate in an acute care facility by 62%<sup>18</sup>. Even though asymptomatic persons are about 15-fold less likely to transmit *C. difficile* than CDI patients, they may substantially contribute to CDI prevalence and spread due to the large size of the reservoir<sup>46</sup>. Colonized hospital staff is another conceivable source for *C. difficile*, but its role for transmission of gastrointestinal pathogens in general has been investigated comparatively little. During this study, samples from the environment and from asymptomatic patients or staff members were not available unfortunately, but studies to quantify effects of these potential reservoirs are highly warranted.

In our hospital, we have implemented an epidemiological surveillance system, ensuring that the detection of *C. difficile* (and of other relevant nosocomial pathogens, e.g. multidrug resistant bacteria) gets communicated to the Preventive Medicine department immediately (i.e., on the same day), to initiate appropriate control measures in the medical wards in case of a suspected outbreak. However, the epidemiological surveillance data alone had not been sufficient to disclose the extent of continued epidemic spread of *C. difficile*.

**Concluding remarks.** Exhaustive whole-genome sequencing revealed that various *C. difficile* strains had caused altogether 17 independent transmission clusters, each containing 2 to 18 cases, and involving a total of 85 patients. Clinicians, hygiene personnel, and healthcare workers had not been aware of this epidemic situation, because the overall frequency of CDI had remained stable at a low level and isolation measures had been considered suitable to prevent transmission of *C. difficile* among patients. The most unexpected result of the present work revealed frequent nosocomial transmission between unrelated patients on separate wards and over time-intervals longer than 90 days. We conclude that in spite of inconspicuous epidemiological data, genome sequencing may be extremely useful to understand the local *C. difficile* situation. Hence, prospective bacterial genome sequencing should be considered for institutional preventive policies of hospitals<sup>47</sup>.

### Data Availability

All genome sequencing data was submitted to the European Nucleotide Archive ([www.ebi.ac.uk/ena](http://www.ebi.ac.uk/ena)) under study number PRJEB28391.



## References

- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L. & Finegold, S. M. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prevot 1938. *Anaerobe* **40**, 95–99, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008> (2016).
- Martin, J. S., Monaghan, T. M. & Wilcox, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**, 206–216, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.25> (2016).
- Davies, K. A. *et al.* Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *Lancet Infect Dis* **14**, 1208–1219, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70991-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70991-0) (2014).
- Indra, A. *et al.* Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol* **57**, 1377–1382, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47714-0> (2008).
- Fawley, W. N. *et al.* Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for *Clostridium difficile*. *PLOS One* **10**, e0118150, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118150> (2015).
- Hunt, J. J. & Ballard, J. D. Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 567–581, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-13> (2013).
- Kuijper, E. J. *et al.* Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* **13** (2008).
- Bouza, E. *et al.* An outbreak of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Spain: risk factors for recurrence and a novel treatment strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **36**, 1777–1786, <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2991-y> (2017).
- Kumar, N. *et al.* Genome-based infection tracking reveals dynamics of *Clostridium difficile* transmission and disease recurrence. *Clin Infect Dis* **62**, 746–752, <https://doi.org/10.1093/cid/civ1031> (2016).
- Eyre, D. W. *et al.* Diverse sources of *Clostridium difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med* **369**, 1195–1205, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1216064> (2013).
- Eyre, D. W. *et al.* Comparison of control of *Clostridium difficile* infection in six English hospitals using whole-genome sequencing. *Clin Infect Dis* **65**, 433–441, <https://doi.org/10.1093/cid/cix338> (2017).
- Eyre, D. W. *et al.* Two distinct patterns of *Clostridium difficile* diversity across Europe indicates contrasting routes of spread. *Clin Infect Dis* **67**, 1035–1044, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy252> (2018).
- Steglich, M. *et al.* Tracing the spread of *Clostridium difficile* ribotype 027 in Germany based on bacterial genome sequences. *PLOS One* **10**, e0139811, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139811> (2015).
- He, M. *et al.* Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* **45**, 109–113, <https://doi.org/10.1038/ng.2478> (2013).
- Durovic, A., Widmer, A. F. & Tschudin-Sutter, S. New insights into transmission of *Clostridium difficile* infection—narrative review. *Clin Microbiol Infect* **24**, 483–492, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.027> (2018).
- Blixt, T. *et al.* Asymptomatic carriers contribute to nosocomial *Clostridium difficile* infection: a cohort study of 4508 patients. *Gastroenterology* **152**, 1031–1041 e1032, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.035> (2017).
- Donskey, C. J. *et al.* Transmission of *Clostridium difficile* from asymptotically colonized or infected long-term care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol* **39**, 909–916, <https://doi.org/10.1017/ice.2018.106> (2018).
- Longtin, Y. *et al.* Effect of detecting and isolating *Clostridium difficile* carriers at hospital admission on the incidence of *C. difficile* infections: a quasi-experimental controlled study. *JAMA Intern Med* **176**, 796–804, <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.0177> (2016).
- Gerding, D. N., Muto, C. A. & Owens, R. C. Jr. Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* **46**(Suppl 1), S43–49, <https://doi.org/10.1086/521861> (2008).
- Murray, S. G. *et al.* Using spatial and temporal mapping to identify nosocomial disease transmission of *Clostridium difficile*. *JAMA Intern Med* **177**, 1863–1865, <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2017.5506> (2017).
- Tschudin-Sutter, S. *et al.* Guidance document for prevention of *Clostridium difficile* infection in acute healthcare settings. *Clin Microbiol Infect* **24**, 1051–1054, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.020> (2018).
- McDonald, L. C. *et al.* Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* **66**, e1–e48, <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085> (2018).
- Cohen, S. H. *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* **31**, 431–455, <https://doi.org/10.1086/651706> (2010).
- Persson, S., Jensen, J. N. & Olsen, K. E. Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and internal in-frame deletion of *tcdC*. *J Clin Microbiol* **49**, 4299–4300, <https://doi.org/10.1128/JCM.05161-11> (2011).
- Bidet, P. *et al.* Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* **38**, 2484–2487 (2000).
- Cammarota, G. *et al.* European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* **66**, 569–580, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017> (2017).
- Steglich, M. *et al.* Convergent loss of ABC transporter genes from *Clostridioides difficile* genomes is associated with impaired tyrosine uptake and p-cresol production. *Front Microbiol* **9**, 901 (2018).
- Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *ArXiv* **1303**, 3997 (2013).
- Koboldt, D. C. *et al.* VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* **22**, 568–576 (2012).
- Didelot, X. & Wilson, D. J. ClonalFrameML: efficient inference of recombination in whole bacterial genomes. *PLoS Comput Biol* **11**, e1004041, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004041> (2015).
- Bauer, M. P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* **377**, 63–73, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61266-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61266-4) (2011).
- Durovic, A., Widmer, A. F., Frei, R. & Tschudin-Sutter, S. Distinguishing *Clostridium difficile* recurrence from reinfection: independent validation of current recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol* **38**, 891–896, <https://doi.org/10.1017/ice.2017.119> (2017).
- Kamboj, M. *et al.* Relapse versus reinfection: surveillance of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* **53**, 1003–1006, <https://doi.org/10.1093/cid/cir643> (2011).
- Eyre, D. W. *et al.* *Clostridium difficile* mixed infection and reinfection. *J Clin Microbiol* **50**, 142–144, <https://doi.org/10.1128/JCM.05177-11> (2012).
- Gerding, D. N. Editorial commentary: whole-genome sequencing of *Clostridium difficile*: exquisitely sensitive but not yet optimally applied. *Clin Infect Dis* **62**, 753–754, <https://doi.org/10.1093/cid/civ1037> (2016).
- Allegretti, J. R. *et al.* Asymptomatic *Clostridium difficile* carriage rate post-fecal microbiota transplant is low: a prospective clinical and stool assessment. *Clin Microbiol Infect* **24**, 780 e781–780 e783, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.022> (2018).
- Dingle, K. E. *et al.* Effects of control interventions on *Clostridium difficile* infection in England: an observational study. *Lancet Infect Dis* **17**, 411–421, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30514-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30514-X) (2017).
- Brazier, J. S., *et al.* Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007–08. *Euro Surveill* **13** (2008).

39. Labbe, A. C. *et al.* *Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3180–3187 (2008).
40. Alcalá, L. *et al.* Group, S. C. d. S. The undiagnosed cases of *Clostridium difficile* infection in a whole nation: where is the problem? *Clin Microbiol Infect* **18**, E204–213, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03883.x> (2012).
41. Zaiß, N. H., Witte, W. & Nübel, U. Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerg Infect Dis* **16**, 675–677 (2010).
42. Shaughnessy, M. K. *et al.* Evaluation of hostal room assingment and acquisition of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* **32**, 201–206 (2011).
43. Zacharioudakis, I. M., Zervou, F. N., Pliakos, E. E., Ziakas, P. D. & Mylonakis, E. Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **110**, 381–390, <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.22> (2015).
44. Kong, L. Y. *et al.* *Clostridium difficile*: Investigating transmission patterns between infected and colonized patients using whole genome sequencing. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy457> (2018).
45. Curry, S. R. *et al.* Use of multilocus variable number of tandem repeats analysis genotyping to determine the role of asymptomatic carriers in *Clostridium difficile* transmission. *Clin Infect Dis* **57**, 1094–1102, <https://doi.org/10.1093/cid/cit475> (2013).
46. Durham, D. P., Olsen, M. A., Dubberke, E. R., Galvani, A. P. & Townsend, J. P. Quantifying transmission of *Clostridium difficile* within and outside healthcare settings. *Emerg Infect Dis* **22**, 608–616, <https://doi.org/10.3201/eid2204.150455> (2016).
47. Peacock, S. J., Parkhill, J. & Brown, N. M. Changing the paradigm for hospital outbreak detection by leading with genomic surveillance of nosocomial pathogens. *Microbiology* **164**, 1213–1219, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000700> (2018).

## Acknowledgements

We thank Vera Junker for excellent technical assistance. This work was partially funded by the EU Horizon 2020 programme, grant agreement number 643476 (to UN), by the Federal State of Lower Saxony, Niedersächsisches Vorab (VWZN3215/ZN3266; to UN), by a travel grant from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC; to SG), and by a research contract from Instituto de Salud Carlos III of Spain (Rio Hortega program, CM17/0033; to SG).

## Author Contributions

S.G., R.C., R.d.C. and U.N. designed the experiments. M.C. and S.G. performed the experiments. S.G., M.F., M.S., A.G., M.C., N.L., J.C., M.M., R.C., R.d.C. and U.N. analysed the data. S.G., R.d.C. and U.N. prepared the manuscript and all authors reviewed and edited the manuscript and approved the final version.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43464-4>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



# Gastroenterología y Hepatología

[www.elsevier.es/gastroenterologia](http://www.elsevier.es/gastroenterologia)



## ORIGINAL

### Resultados de la implementación de un programa multidisciplinar de trasplante de microbiota fecal por colonoscopia para el tratamiento de la infección recurrente por *Clostridium difficile*

Antonio López-Sanromán<sup>a,b,\*</sup>, Enrique Rodríguez de Santiago<sup>a</sup>,  
Javier Cobo Reinoso<sup>b,c</sup>, Rosa del Campo Moreno<sup>b,d</sup>, José Ramón Foruny Olcina<sup>a,b</sup>,  
Sergio García Fernández<sup>d</sup>, Ana García García de Paredes<sup>a</sup>, Lara Aguilera Castro<sup>a</sup>,  
Carlos Ferre Aracil<sup>a</sup> y Agustín Albillos Martínez<sup>a,b,e</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

<sup>b</sup> Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, España

<sup>c</sup> Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

<sup>d</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

<sup>e</sup> Universidad de Alcalá de Henares, CIBERHD, Madrid, España

Recibido el 27 de diciembre de 2016; aceptado el 13 de marzo de 2017

#### PALABRAS CLAVE

Trasplante de  
microbiota fecal;  
Colonoscopia;  
*Clostridium difficile*

#### Resumen

**Introducción:** La recurrencia de la infección por *Clostridium difficile* (ICD) es frecuente y a menudo difícil de controlar. El trasplante de microbiota fecal (TMF) es una opción terapéutica avalada en estos casos, aunque se desconoce su aplicabilidad y efectividad en nuestro medio. **Objetivos:** Analizar los aspectos técnicos, seguridad y efectividad del primer programa consolidado de TMF en España.

**Métodos:** Estudio retrospectivo descriptivo de todos los pacientes con ICD recurrente tratados mediante TMF por colonoscopia en un hospital de tercer nivel tras la implantación de un protocolo multidisciplinar entre marzo de 2015 y septiembre 2016.

**Resultados:** Se realizaron 13 TMF en 12 pacientes (11/12; 91,7% mujeres) con una mediana de edad de 84,6 años (rango: 38,2-98,2). En todos los casos la indicación fue la recurrencia de la ICD. Los pacientes habían presentado una mediana de 3 episodios previos de ICD (rango: 2-6) y en todos había fracasado el tratamiento con fidaxomicina. Todos los procedimientos se realizaron mediante colonoscopia. La efectividad con una sesión de TMF fue del 91,7% (11/12; IC 95%: 64,6-98,5%). En la paciente no respondedora se realizó un segundo TMF a los 17 días con desaparición de la sintomatología. No se registraron efectos adversos secundarios al procedimiento endoscópico ni al TMF tras una mediana de seguimiento de 6,5 meses (rango: 1-16 meses). Dos pacientes fallecieron durante el seguimiento por causas no relacionadas con el TMF.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [alsanroman@salud.madrid.org](mailto:alsanroman@salud.madrid.org) (A. López-Sanromán).



## KEYWORDS

Faecal microbiota  
transplantation;  
Colonoscopy;  
*Clostridium difficile*

**Conclusiones:** El TMF por colonoscopia es una alternativa terapéutica efectiva y segura en la recurrencia de la ICD. Se trata de un procedimiento sencillo que debería implementarse en más centros en nuestro entorno.

© 2017 Elsevier España, S.L.U., AEEH y AEG. Todos los derechos reservados.

## Results of the implementation of a multidisciplinary programme of faecal microbiota transplantation by colonoscopy for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection

### Abstract

**Introduction:** Recurrent *Clostridium difficile* infection (CDI) is common and often difficult to manage. Faecal microbiota transplant (FMT) is an effective therapeutic tool in these cases, although its applicability and effectiveness in Spain is currently unknown.

**Aim:** To analyse the technical aspects, safety and effectiveness of the first consolidated FMT programme in Spain.

**Methods:** Retrospective descriptive study of all patients with recurrent CDI treated with FMT performed by colonoscopy in a tertiary centre after the implementation of a multidisciplinary protocol between March 2015 and September 2016.

**Results:** A total of 13 FMT were performed in 12 patients (11/12; 91.7% women) with a median age of 84.6 years (range: 38.2-98.2). Recurrence of CDI was the indication for FMT in all cases. Patients had suffered a median of 3 previous episodes of CDI (range: 2-6) and all had failed treatment with fidaxomicin. All procedures were performed by colonoscopy. Effectiveness with one session of FMT was 91.7% (11/12; 95% CI: 64.6 to 98.5%). In the non-responder patient, a second FMT was performed 17 days after the first procedure, with disappearance of symptoms. No side effects related to the endoscopic procedure or the FMT were recorded after a median follow-up of 6.5 months (range: 1-16 months). Two patients died during follow-up due to causes unrelated to FMT.

**Conclusion:** FMT by colonoscopy is an effective and safe therapeutic alternative in recurrent CDI. It is a simple procedure that should be implemented in more centres in Spain.

© 2017 Elsevier España, S.L.U., AEEH y AEG. All rights reserved.

## Introducción

*Clostridium difficile* (CD) es la primera causa de diarrea nosocomial en el mundo occidental y se asocia a una elevada morbilidad y consumo de recursos sanitarios<sup>1</sup>. El tratamiento clásico se basa en la retirada del antibiótico desencadenante y el empleo de metronidazol, vancomicina o, más recientemente, fidaxomicina. A pesar de ello, un número significativo de pacientes no responden al tratamiento inicial o sufren una recurrencia (2-38%) en las primeras 8 semanas<sup>2</sup>.

En el año 1958 Eiseman et al. publicaron una serie de 4 casos de enterocolitis pseudomembranosa tratados exitosamente con enemas de material fecal<sup>3</sup>. Este abordaje de la enfermedad, conceptualmente desafiante con la visión vigente en aquella época de la microbiota como un elemento nocivo, cayó en el olvido de la comunidad científica durante más de medio siglo. No ha sido hasta la última década, y especialmente durante el último lustro, cuando el trasplante de microbiota fecal (TMF) se ha posicionado como una de las terapias con mayor interés teórico y práctico en el ámbito de la Gastroenterología, los procesos autoinmunes y las enfermedades metabólicas. Las guías de práctica clínica ya incluyen esta modalidad terapéutica como una

alternativa en casos de recurrencias múltiples de infección por CD (ICD) y se dispone de ensayos clínicos sobre su eficacia en enfermedad inflamatoria intestinal<sup>4-6</sup>. En el año 2013, ante la aparición de los primeros ensayos de TMF en la ICD, diseñamos un programa multidisciplinar (Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Servicio de Microbiología y Servicio de Enfermedades Infecciosas) en nuestro centro. Hasta la fecha, no existen datos que evalúen los resultados del TMF en nuestro país. El objetivo de este trabajo es analizar la efectividad y seguridad del TMF tras la implantación de este programa.

## Material y métodos

### Diseño y población del estudio

Estudio descriptivo retrospectivo en el que se presentan todos los casos de TMF realizados para el tratamiento de la ICD recurrente en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid (España) entre marzo de 2015 y septiembre de 2016. El éxito del TMF se ha definido como la ausencia de diarrea (3 o más deposiciones al día) en las 8 semanas posteriores al procedimiento.

## Recogida de datos

Se recogieron de la historia clínica y de la base de datos electrónica de la Unidad de Endoscopias (Endobase, Olympus®) variables demográficas, clínicas, analíticas, microbiológicas y endoscópicas mediante un cuaderno de recogida de datos específicamente diseñado con 48 ítems. El seguimiento de los pacientes se ha completado mediante entrevista telefónica y mediante el sistema de información sanitaria Horus que permite visualizar las consultas y sus motivos en atención primaria.

## Descripción del protocolo del trasplante de microbiota fecal

### Indicación del trasplante de microbiota fecal (receptor)

El Servicio de Enfermedades Infecciosas es el principal responsable del manejo clínico de los pacientes con ICD, y el que habitualmente establece la indicación de TMF. Puesto que fidaxomicina se emplea en los pacientes con elevado riesgo de recurrencia o recurrencias múltiples, se considera candidato potencial a TMF a cualquier paciente que reciba este fármaco (tabla 1). Si el paciente acepta este tratamiento se le remite a la Consulta de Gastroenterología para la selección del donante. En el caso de recurrencia de la ICD confirmada microbiológicamente tras el tratamiento con fidaxomicina el paciente es tratado con vancomicina y se programa la colonoscopia para el TMF, suspendiendo la vancomicina 2 días antes.

### Donante

El Servicio de Gastroenterología y Hepatología es el responsable del estudio ambulatorio de los potenciales donantes (tabla 2). En primer lugar se le entrega el consentimiento informado y, tras su firma, se procede a realizar una anamnesis general, exploración clínica y un cuestionario específicamente diseñado (tabla 3). Si tras esta evaluación inicial no existe una contraindicación se obtienen muestras de sangre y heces (tabla 4). El estudio predonación se considera válido durante un periodo de 3 meses desde la primera visita. Se instruye al donante que, si cambia su situación clínica o epidemiológica de forma relevante hasta el día del procedimiento, avise al médico responsable del TMF y lo ponga en su conocimiento. En la mañana del procedimiento, el donante debe aportar en el laboratorio de Microbiología una deposición completa lo más reciente posible. Es preferible que el TMF se realice en las primeras 6 h desde la defecación, no siendo recomendable la utilización de muestras de más de 24 h<sup>7</sup>. Se debe interrogar al donante en ese momento si en los días previos ha presentado algún síntoma de infección (fiebre, diarrea, vómitos, dolor abdominal), si ha consumido en los últimos 5 días alimentos a los que el receptor sea alérgico (conocido o sospechado) o si ha tomado recientemente algún fármaco que pueda influir en la composición de la microbiota (fundamentalmente antibióticos); en cuyo caso la donación no sería válida y el procedimiento debería suspenderse.

### Procesamiento de las muestras

El procesamiento y análisis de las heces de donante y receptor es llevado a cabo por el Servicio de Microbiología. Las

muestras deben ser manejadas siempre en el laboratorio, bajo una campana de flujo laminar y con equipos de protección individual por contacto (nivel 2 de bioseguridad) que incluyan delantal, guantes, mascarilla y protector ocular. Para la obtención de la solución de microbiota se solubilizan 100 g de material fecal con 500 ml de suero salino fisiológico (ClNa 0,9%) con una batidora destinada exclusivamente para el TMF. Una vez obtenida la solución homogénea se centrifuga para depositar la fibra y las partes insolubles, y se recoge el sobrenadante en 10 jeringuillas de 50 ml de cono estrecho aptas para el colonoscopio. El procesamiento de la muestra debe coordinarse con la Unidad de Endoscopias, para comenzar la preparación unos 30 min antes de la colonoscopia y evitar que la muestra se quede mucho tiempo sin refrigeración, ya que una vez preparadas se conservan a temperatura ambiente para evitar la hipotermia durante la instilación.

### Procedimiento endoscópico

La preparación para la colonoscopia se realiza con solución evacuable de polietilenglicol 4 l, con dosis fraccionada, comenzando la tarde previa al TMF. En los pacientes que presenten un peor estado general o comorbilidad significativa se contempla la posibilidad de utilizar soluciones de preparación de menor volumen o realizar la preparación en régimen de hospitalización.

Durante la colonoscopia, todo el personal implicado está equipado con medidas de protección por contacto. Los procedimientos se realizan con sedación como norma general (bien por un anestesiólogo, bien por un endoscopista, en función de las características del paciente). La colonoscopia se realiza con mínima insuflación a la entrada, al llegar al ciego se obtienen 2 biopsias de ciego para estudio microbiológico. Una vez alcanzado el ciego, se procede a iniciar la instilación del TMF a través del canal de trabajo del colonoscopio siguiendo el siguiente esquema en retirada: 350 ml de solución fecal en el colon derecho, 100 ml en el colon transversal y los 50 ml restantes en el colon izquierdo. Durante la extracción del endoscopio se debe evitar la aspiración para evitar la retirada del material trasplantado.

Una vez finalizado el procedimiento y una vez recuperado el paciente de la sedación, se le administran 2 mg de loperamida por vía oral y se le instruye para que intente retener la solución administrada la mayor cantidad de tiempo posible (idealmente durante al menos 4-6 h). Posteriormente debe guardar reposo en cama durante 24 h pudiendo reanudar una dieta ajustada a su situación clínica, sin otras restricciones, a las 6 h del procedimiento.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el programa Stata versión 14.0 (StataCorp®, Texas, EE. UU.). Los datos cuantitativos se presentan utilizando la mediana como medida de tendencia central y el rango como medida de dispersión debido a la marcada asimetría de las distribuciones. Los datos cualitativos se presentan en forma de frecuencias absolutas y relativas. El éxito clínico se ha definido como una variable dicotómica y su intervalo de confianza al 95% se ha estimado con el método de Wilson. No se han realizado

**Tabla 1** Criterios de selección y datos a recoger del receptor de TMF

<i>Datos a recoger en la historia clínica</i>	<i>Criterios de inclusión</i>
Enfermedad actual por CD: número de deposiciones diarias, otros síntomas, criterios de gravedad clínicos y analíticos	Firma del consentimiento informado por parte del paciente o de su representante legal
Episodios previos de enfermedad por CD: número, tratamiento recibido y gravedad de los mismos	Edad superior a 18 años
Constantes vitales: tensión arterial, frecuencia cardíaca, temperatura axilar, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno	Segunda recidiva (tercer episodio) de la enfermedad por CD tras tratamiento adecuado de los episodios previos
Peso, talla e IMC	<i>Criterios de exclusión</i>
Antecedentes médicos, incluyendo hábitos tóxicos, hábitos sexuales y conductas de riesgo para la transmisión de infecciones	Pacientes en tratamiento inmunosupresor: corticosteroides a altas dosis, inhibidores de la calcineurina, fármacos biológicos, quimioterapia con recuento de neutrófilos < 500
Antecedentes quirúrgicos	Cirrosis hepática descompensada, VIH en estadio C, trasplante de progenitores hematopoyéticos y otras causas de inmunodeficiencia grave
Antecedentes vacunales	Pacientes terminales (expectativa de vida < 2 meses)
Alergias a medicamentos y alimentos	
Viajes recientes: país, región (rural o urbana), tiempo de estancia, dieta, actividades, etc.	
Embarazos, transfusiones, trasplantes u otras situaciones con riesgo de aloinmunización	
Tratamiento médico habitual y el esporádico en los últimos 3 meses (especialmente IBP y antibióticos)	
Antecedentes familiares relevantes	
Dieta habitual	
Exploración física completa	

CD: *Clostridium difficile*; IBP: inhibidores de la bomba de protones; IMC: índice de masa corporal; TMF: trasplante de microbiota fecal; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

**Tabla 2** Criterios de inclusión y de exclusión del donante

<i>Criterios de exclusión</i>	<i>Criterios de inclusión</i>
Incapacidad legal para otorgar el consentimiento informado	Firma del consentimiento informado
Enfermedades infecciosas potencialmente transmisibles	Edad de 18 a 65 años
Trabajadores sanitarios	IMC entre 18 y 35 kg/m <sup>2</sup>
Contactos o conductas de riesgo en los últimos 12 meses	Buen estado general de salud (ECOG 0)
Tatuajes o <i>piercing</i> en los últimos 6 meses	
Viaje en el último año a países con enfermedades diarreicas endémicas o con alto riesgo de diarrea del viajero (según OMS)	
Uso de antibióticos, IBP o fármacos inmunosupresores en los últimos 3 meses	
Consumidor de más de 28 UBE semanales	
Consumo de drogas ilícitas	
Diarrea aguda o crónica	
Estreñimiento (criterios Roma III)	
Cirugía mayor en el aparato digestivo, excluyendo apendicectomía	
Proceso oncológico activo o historia de cáncer en los últimos 10 años	
Enfermedad inflamatoria intestinal	
SII o dispepsia funcional (criterios Roma III)	
Hepatopatía o enfermedad renal crónicas	
Enfermedades autoinmunes y sistémicas	
Síndrome metabólico (criterios ATP III)	
Enfermedad neuropsiquiátrica	
Enfermedad vascular significativa	

ATP: Adult Treatment Panel; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; IBP: inhibidores de la bomba de protones; IMC: índice de masa corporal; OMS: Organización Mundial de la Salud; SII: síndrome del intestino irritable; UBE: unidades de bebida estándar.

Cómo citar este artículo: López-Sanromán A, et al. Resultados de la implementación de un programa multidisciplinar de trasplante de microbiota fecal por colonoscopia para el tratamiento de la infección recurrente por *Clostridium difficile*. Gastroenterol Hepatol. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2017.03.004>

**Tabla 3** Cuestionario para la selección de donantes

Como usted sabe, puede que sea seleccionado para actuar como donante en un trasplante de microbiota fecal. Es de vital importancia que conteste con veracidad y sinceridad a las preguntas que se le van a formular a continuación

- ☐ SI ☐ NO ¿Padece o ha padecido alguna enfermedad importante (del corazón, pulmones, riñones, hígado, neurológica, del tubo digestivo, etc.)? ¿Y en la infancia? ¿Ha recibido adecuadamente todas las vacunas del calendario vacunal?
- ☐ SI ☐ NO ¿Está en seguimiento por algún médico especialista por algún problema de salud o ha estado ingresado en un hospital alguna vez?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha sido vacunado recientemente contra la poliomielitis o ha recibido recientemente cualquier otra vacuna que se administre por vía oral?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha recibido cualquier otro tipo de vacuna recientemente?
- ☐ SI ☐ NO ¿Le han operado de algo alguna vez?
- ☐ SI ☐ NO ¿Es alérgico a algún medicamento o alimento?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tomado en los últimos 3 meses algún antibiótico u otro medicamento para tratar infecciones?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tomado en los últimos 3 meses algún medicamento inmunosupresor como los corticoesteroides?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tomado en los últimos 3 meses algún medicamento supresor del ácido gástrico («protector de estómago») como el omeprazol?
- ☐ SI ☐ NO Por favor, indique los medicamentos que toma de forma habitual y los que ha tomado de forma esporádica recientemente
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha recibido alguna vez alguna transfusión de sangre o de productos derivados de la sangre?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha recibido alguna vez algún injerto de tejidos, órganos o médula ósea?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha recibido algún injerto de piel o hueso?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha recibido alguna vez un injerto de duramadre (meninge que cubre el cerebro)?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha estado en contacto con la sangre de otra persona o se ha pinchado con algún material cortante o punzante que pudiera estar contaminado con la sangre o fluidos de otra persona?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tenido contacto sexual con alguna persona con VIH o sida?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tenido contacto sexual con alguna persona que reciba dinero o drogas como pago por el sexo?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tenido contacto sexual con alguien que tenga hemofilia o haya utilizado concentrados de los factores de la coagulación?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tenido contacto sexual con personas con hepatitis?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tenido múltiples parejas sexuales durante los últimos meses?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha tenido contacto sexual con alguien que haya recibido tratamiento para la sífilis o la gonorrea?
- ☐ SI ☐ NO ¿Vive con una persona que tenga VIH/sida o hepatitis?
- ☐ SI ☐ NO ¿Alguna vez ha practicado sexo por dinero, drogas u otros objetos?
- ☐ SI ☐ NO ¿Consume o ha consumido alguna droga ilícita por vía intravenosa, inhalada, esnifada o por cualquier otra vía?
- ☐ SI ☐ NO ¿Bebe alcohol de forma habitual? ¿Fuma? ¿Cuánto?
- ☐ SI ☐ NO Si es mujer, ¿existen posibilidades de que esté embarazada?
- ☐ SI ☐ NO ¿Se ha hecho algún tatuaje, piercing, acupuntura o cualquier otro procedimiento donde se utilicen agujas en la piel? ¿Cuándo y dónde?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha utilizado agujas para inyectarse drogas, esteroides o cualquier otra sustancia ilícita o no prescrita por su médico?
- ☐ SI ☐ NO ¿Ha estado fuera de España en los 3 últimos años? Comente con su médico los viajes y las actividades que realizó.
- ☐ SI ☐ NO Entre 1980 y 1996 ¿Estuvo durante más de 3 meses en el Reino Unido?
- ☐ SI ☐ NO ¿Alguna vez ha padecido malaria, enfermedad de Chagas o babesiosis? (son parásitos que afectan a la sangre)
- ☐ SI ☐ NO ¿Alguno de sus parientes padece la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (¿enfermedad de las «vacas locas»?)

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

**Tabla 4** Estudios realizados al donante

Estudios en sangre	Estudios en heces
Hemograma	Estudio de larvas y huevos de parásitos en heces (3 muestras)
Bioquímica: iones, función renal, perfil hepático, urea, calcio, magnesio, fósforo, lípidos en plasma y TSH	Coprocultivo
Inmunoglobulinas séricas	Antígeno de <i>Giardia lamblia</i>
Estudio de hemostasia	GDH y toxinas A y B de CD
Serología viral: VIH, VHB, VHC, VHA, VHE, HTLV 1 y 2, sífilis, CMV <sup>a</sup> y VEB <sup>a</sup>	Tinción de Kinyoun
Detección por PCR de ácidos nucleicos: VIH y VHB	

CD: *Clostridium difficile*; CMV: citomegalovirus; GDH: glutamato deshidrogenasa; HTLV: virus linfotrofo de células T humanas; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TSH: hormona estimulante de la tiroides; VEB: virus de Epstein-Barr; VHA: virus de la hepatitis A; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VHE: virus de la hepatitis E; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

<sup>a</sup> La seroincompatibilidad donante-receptor no fue un criterio de exclusión.

pruebas de significación ni estimación del tamaño muestral por el diseño del estudio.

## Aspectos éticos

Ante la falta de regulación nacional o europea para este procedimiento, y una vez consultados el Comité de Ensayos Clínicos y el Comité Ético Asistencial local, además de la Organización Nacional de Trasplantes, se dio comienzo al programa con una autorización específica de la dirección del centro. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Ramón y Cajal. Todos los donantes y receptores firmaron el consentimiento informado para la realización del procedimiento.

## Resultados

Se estudiaron un total de 16 donantes con una mediana de un donante (rango: 0-2) por cada receptor; en 11 (84,6%) casos el donante estaba emparentado. Se realizaron un total de 13 TMF a 12 pacientes con una mediana de edad de 84,6 años (rango: 38,2-98,2), 11 (91,7%) de ellos mujeres (tabla 5). Una paciente hinduista rechazó el TMF por motivos religiosos. Cuatro pacientes no pertenecían a nuestra institución y fueron referidos a nuestro centro para el procedimiento. La indicación en todos los casos fue la recurrencia múltiple de la ICD. Ningún paciente recibía inmunosupresores. Todos los pacientes habían recibido previamente fidaxomicina. La mediana de episodios previos al TMF fue de 3 (rango: 2-6) con una mediana de 68,5 días (rango: 24-306) entre el inicio del primer episodio de ICD y el primer TMF. Veinticuatro horas antes del TMF la mediana de deposiciones al día era de 3,5 (rango: 2-12), en 2 sujetos las heces eran sanguinolentas, 7 presentaban dolor abdominal y 2 náuseas. Todos los procedimientos se realizaron mediante colonoscopia lográndose intubar el ciego en 9 (69,2%), alcanzar el colon ascendente proximal en 3 pacientes y en un caso únicamente se accedió hasta el sigma. Se utilizaron 500 ml de solución fecal filtrada en todos los casos; instilando 350 ml en ciego y colon derecho, 100 ml en transverso y 50 ml en colon descendente en 12 TMF; en uno se inyectó toda la solución en sigma y recto. En 5 TMF la sedación fue realizada por el endoscopista, en 7 por un anestesiólogo y un paciente no recibió sedación.

Once de los sujetos fueron preparados con 4 l de solución evacuable de polietilenglicol, una paciente recibió solo 2 l de polietilenglicol por su comorbilidad de base (insuficiencia cardíaca crónica y cirrosis hepática). Como hallazgos incidentales durante la endoscopia se objetivaron: divertículos no complicados en 3 pacientes (25%), eritema y edema en 2 (16,6%), pseudomembranas en uno, un adenoma de aspecto vellosa en ciego de 4 cm y un pólipo pediculado de 1 cm en recto.

Se realizaron en régimen de hospitalización 12/13 (92,3%) TMF con una mediana de hospitalización post-TMF de 2,5 días (rango: 0-8), ningún paciente precisó traslado a la Unidad de Cuidados Intensivos. A las 48 h del TMF la sintomatología de todos los sujetos había remitido con una mediana de una deposición diaria (rango: 0-2). La efectividad con una sesión de TMF fue del 91,7% (11/12; IC 95%: 64,6-98,5%). En la paciente no respondedora, en la que únicamente se alcanzó el sigma en la colonoscopia, se llevó a cabo un segundo TMF con heces de la misma donante a los 17 días con desaparición de los síntomas. No se registraron efectos adversos secundarios al procedimiento endoscópico ni al TMF tras una mediana de seguimiento de 6,5 meses (rango: 1-16 meses). Dos pacientes fallecieron durante el seguimiento por causas no relacionadas con el TMF (adenocarcinoma gástrico terminal y edema agudo de pulmón). Una paciente procedente de otra comunidad autónoma presentó una diarrea leve tras la toma de antibióticos a los 3 meses del TMF que fue tratada por sus médicos con vancomicina. Durante el seguimiento posterior no ha vuelto a presentar diarrea.

## Discusión

Estudios recientes demuestran que la recurrencia de la ICD se asocia a elevados costes, reingresos hospitalarios e incluso mayor mortalidad<sup>8,9</sup>. Aunque fidaxomicina es superior a los tratamientos clásicos algunos pacientes presentan recurrencias, especialmente cuando se emplea en pacientes con recurrencias múltiples<sup>10</sup>. El TMF constituye una alternativa excelente en esta situación, sin embargo, actualmente no existen datos publicados de su efectividad en nuestro país.



Tabla 5 Características de los pacientes

Paciente	Comorbilidad	Tratamiento previo CD	Éxito 1.º TMF	Observaciones
85 ♀	Bronquiectasias Antecedente de TEP Neumonías de repetición Hipercolesterolemia	MTZ, VAN, FDX	Sí	Primer TMF en el centro
81 ♀	HTA ITU de repetición	MTZ, VAN, FDX	Sí	
84 ♀	HTA ADC gástrico T4N3 Marcapasos Nutrición parenteral	MTZ, VAN, FDX	Sí	Fallece por ADC terminal
92 ♀	HTA DM	MTZ, VAN, FDX	Sí	
84 ♀	DM, ERC, CI, Prótesis mitral metálica, ACV 2013, hipotiroidismo, anemia	VAN, FDX	Sí	Seudomembranas en colonoscopia
89 ♀	HTA, DM, Cirrosis CHILD B, ICC Parkinson, DABVD LNH	VAN, FDX	No	17 días después se realiza el segundo TMF con éxito Fallece 10 días después por edema agudo de pulmón
84 ♀	HTA, DM, ACV, síndrome mielodisplásico, ACV 2015	MTZ, VAN, FDX, VAN	Sí	
75 ♀	HTA, ERC, SAHS, antecedente de TEP	MTZ + VAN, FDX	Sí	
42 ♀	HTA, DM, CI Psoriasis Antecedente de tuberculosis	MTZ, VAN, RFX, FDX con probióticos	Sí	
38 ♀	ICC secundaria a síndrome congénito con múltiples fístulas arteriovenosas	MTZ, VAN, FDX	Sí	
75 ♂	HTA, EPOC, ADC estadio IV, alcoholismo Antecedente de ADC de próstata y pulmón	MTZ + VAN, FDX	Sí	
98 ♀	ERC, demencia, ITU de repetición	MTZ, VAN, FDX, VAN, FDX	Sí	Adenoma vellosa en ciego de 4 cm que no se extirpó por situación basal de la paciente

ACV: accidente cerebrovascular; ADC: adenocarcinoma; CD: *Clostridium difficile*; CI: cardiopatía isquémica; DABVD: dependiente para las actividades básicas de la vida diaria; DM: diabetes mellitus; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC: enfermedad renal crónica; FDX: fidaxomicina; HTA: hipertensión arterial; ICC: insuficiencia cardíaca congestiva; ITU: infecciones del tracto urinario; LNH: linfoma no Hodgkiniano; MTZ: metronidazol; RFX: rifaximina; SAHS: síndrome de apneas-hipoapneas del sueño; TEP: tromboembolismo pulmonar; TMF: trasplante de microbiota fecal; VAN: vancomicina.

El primer eslabón del TMF es el donante de microbiota; aún existe mucha controversia sobre cuál es el cribado más eficiente y qué grado de parentesco debe guardar con el receptor. En nuestro protocolo los criterios de inclusión y exclusión se basan principalmente en la revisión de Bakken et al. (tablas 2 y 3); si bien son bastante restrictivos, consideramos que esta actitud se justifica por el riesgo de transmisión de patógenos y la disponibilidad ilimitada de donantes<sup>7</sup>. En nuestro estudio, 11 de 13 TMF se realizaron con donantes emparentados. Estos tienen la ventaja de una mayor accesibilidad y de compartir factores de riesgo ambientales, lo cual podría minimizar el riesgo de transmisión de infecciones<sup>7</sup>. No obstante, un metaanálisis que incluyó a 273 pacientes no observó diferencias estadísticamente significativas en la tasa de resolución

clínica entre donantes anónimos y relacionados con el receptor<sup>11</sup>.

En todos nuestros pacientes se utilizaron heces frescas por ser el método de elección cuando se diseñó el protocolo, pero se ha demostrado que se pueden almacenar congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta 6 meses sin pérdida de viabilidad<sup>12</sup>. De hecho, recientemente Lee et al. han publicado un ensayo clínico con 219 pacientes en el que encontraron que el rendimiento del material fecal congelado es no inferior al de muestras frescas<sup>13</sup>. Las heces congeladas permiten reducir el coste dado que se puede realizar más de un trasplante con el mismo donante. Además, facilita el TMF en pacientes sin familia o sin donantes accesibles o adecuados. Respecto al volumen de heces, se administraron 500 ml de solución de microbiota en todos los pacientes. Esta decisión se basó

en la revisión sistemática de Gough et al. donde la tasa de resolución de ICD se asoció de forma directamente proporcional al volumen infundido (97% con > 500 ml frente al 80% si < 200 ml)<sup>14</sup>. Además, esta revisión encontró que la recurrencia fue 4 veces más frecuente cuando el peso de las heces era < 50 g; motivo por el cual en nuestro protocolo se utilizaron 100 g<sup>14</sup>.

Los enemas fueron inicialmente empleados hasta que en 1991 se incorporó la vía duodenal y posteriormente en el año 2000 la colonoscopia, que se ha convertido en la más utilizada en la actualidad<sup>6,15,16</sup>. A pesar de que a día de hoy la ruta óptima no está claramente establecida dado que no se dispone de estudios comparativos específicamente diseñados para este fin, la colonoscopia nos parece la mejor opción por haber mostrado un mayor éxito terapéutico frente a la vía alta en varias revisiones sistemáticas (89-92% versus 76-82%), así como por una teórica mejor aceptación por parte del paciente<sup>11,14</sup>. Asimismo, la colonoscopia permite instilar la solución en todo el colon e incluso en íleon terminal, a diferencia de los enemas que únicamente alcanzan el ángulo esplénico por lo que hipotéticamente podrían ser menos eficaces. La colonoscopia ofrece además la posibilidad de visualizar la mucosa colónica y de esta forma valorar la gravedad de la enfermedad, obtener muestras histológicas y valorar la presencia de enfermedad concomitante. En nuestra serie, la mucosa presentaba un aspecto normal en todos los pacientes excepto en 3 (23%) en los que se evidenciaron hallazgos relacionados con la ICD; además se detectaron 2 lesiones preneoplásicas, hallazgos similares a lo descrito en series previas<sup>17,18</sup>.

Es importante resaltar que cuando se opta por la colonoscopia se deben extremar las precauciones durante el procedimiento utilizando mínima insuflación y no forzando el paso por ángulos difíciles, lo que explica la baja tasa de intubación cecal en nuestra serie. En cuanto a la necesidad de preparación previa a la colonoscopia, el uso de soluciones evacuantes parece reducir la densidad de bacterias de CD e incluso de sus esporas, por lo que los expertos recomiendan su uso el día previo a la realización del TMF independientemente de la vía de administración empleada<sup>19</sup>.

Los receptores del TMF para la ICD suelen ser pacientes frágiles, de edad avanzada y con múltiples comorbilidades, características que reunían la mayoría de los pacientes tratados en nuestro centro (tabla 5)<sup>16,20</sup>. No se realizó ningún TMF en pacientes que recibieran inmunosupresores por ser un criterio de exclusión en el protocolo inicial. No obstante, es probable que deba modificarse este criterio ya que diversos grupos de trabajo han comunicado resultados favorables sin un incremento del riesgo de eventos infecciosos<sup>21,22</sup>.

Con relación a la definición de recurrencia y curación de la infección, existe una gran heterogeneidad en los distintos estudios, lo que explica parte de la variabilidad en las tasas de éxito publicadas. La mayoría de los trabajos basan la definición de curación en criterios exclusivamente clínicos (desaparición de la diarrea) con intervalos que van desde una semana hasta 6 meses<sup>16</sup>. En el presente estudio hemos definido curación como la ausencia de diarrea en las primeras 8 semanas post-TMF, en consonancia con las recomendaciones del Colegio Americano de Gastroenterología (ACG) y la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID)<sup>2,6</sup>. El éxito clínico con

un procedimiento fue del 91,7% (IC 95%: 64,6-98,5%), siendo necesario un segundo TMF en un caso por recurrencia de la infección tras el primer TMF. Estos resultados positivos son concordantes con los obtenidos en ensayos clínicos y estudios no controlados<sup>16,18,23</sup>.

Actualmente, no existe suficiente evidencia para determinar el número o la frecuencia de infusiones necesarias. En la revisión sistemática de 2016 de Chapman et al. el número de TMF por paciente osciló entre 1 y 10, siendo la causa más frecuente de repetición del procedimiento la recurrencia de la infección<sup>16</sup>. En otra revisión sistemática con 801 casos de TMF con diversas indicaciones, el 83,3% de los pacientes recibieron una única instilación<sup>15</sup>.

En nuestro estudio solo un procedimiento se realizó ambulatoriamente por la fragilidad de los sujetos tratados. En un futuro, si las indicaciones de TMF se amplían o si se prioriza su uso en la escala terapéutica de la ICD, es esperable que una parte importante de los procedimientos se puedan realizar de forma ambulatoria.

En términos generales, los efectos adversos del TMF son escasos, leves y transitorios. El sesgo de publicación, el carácter retrospectivo de muchas de las series y la escasez de datos a largo plazo obligan a interpretar con cautela la información disponible. A pesar del estricto cribado de los donantes, existe el riesgo potencial de transmisión de patógenos; de hecho, se han notificado 2 casos de gastroenteritis aguda por Norovirus post-TMF<sup>24</sup>. En los primeros días los efectos adversos más habituales son el dolor abdominal, náuseas, vómitos, sensación de hinchazón, diarrea y flatulencia. Otros efectos secundarios descritos son el estreñimiento, vómitos, prurito, parestesias, clínica catarral, cefalea, aparición de ampollas en la lengua y fiebre pasajera<sup>25</sup>. En nuestra serie no se han registrado efectos adversos a corto ni medio plazo, aunque es posible que síntomas menores (náuseas, malestar abdominal, etc.) hayan pasado desapercibidos por su carácter retrospectivo. Dos pacientes fallecieron durante el seguimiento, una por un adenocarcinoma gástrico terminal y otra por un cuadro de edema agudo de pulmón 10 días después del segundo TMF. Aunque se podría hipotetizar sobre una posible asociación entre la preparación de la colonoscopia y este último fallecimiento, consideramos que esta opción es muy poco probable ya que la paciente fue dada de alta 5 días después de la colonoscopia encontrándose estable desde el punto de vista cardiorrespiratorio, se utilizó una preparación de bajo volumen y en sus antecedentes figuraban múltiples ingresos por descompensaciones de su insuficiencia cardíaca crónica (tabla 5). Hasta el momento, con más de 1.000 casos publicados en la literatura, no existe ningún fallecimiento con una relación causal directa con el TMF.

Desde el punto de vista económico, merece la pena resaltar que la puesta en marcha del TMF en el centro no supuso a priori un aumento del gasto para el sistema, utilizándose recursos humanos y materiales ya disponibles para la actividad asistencial habitual y que se encuentran al alcance de cualquier hospital de tercer nivel. De hecho, existen varios estudios que avalan su eficiencia<sup>26,27</sup>.

Las principales limitaciones de este trabajo son su pequeño tamaño muestral, la heterogeneidad de los sujetos incluidos y la recogida retrospectiva de la información. Aun así, consideramos que es válido como prueba de

concepto de la aplicabilidad y efectividad del TMF en nuestro entorno.

Los principales retos futuros del TMF son la estandarización y simplificación de sus pasos, verificar si es posible aislar las subpoblaciones de microbiota que realmente tienen poder terapéutico, mejorar el conocimiento de sus efectos a largo plazo, conocer su efectividad en casos refractarios de ICD y definir su verdadera utilidad en otras enfermedades. Actualmente están en marcha ensayos clínicos en enfermedad inflamatoria intestinal, encefalopatía hepática, colangitis esclerosante primaria, pancreatitis aguda, síndrome del intestino irritable, estreñimiento, esteatohepatitis no alcohólica, síndrome metabólico, erradicación de bacterias multiresistentes en portadores rectales, VIH y epilepsia<sup>28,29</sup>.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en nuestro centro proporcionan una prueba más de la efectividad y seguridad del TMF por colonoscopia en la ICD recurrente. Se trata de un procedimiento sencillo, avalado por la evidencia científica y cuya realización es factible en nuestro medio mediante un trabajo que requiere de un equipo interdisciplinar. Su uso, más allá del valor como herramienta de investigación que pueda tener, responde a una necesidad asistencial actual y creciente. En consecuencia, consideramos que debería promoverse su implementación en otros centros de tercer nivel para facilitar su accesibilidad, permitir la centralización de las tareas y favorecer la conformación regional de bancos de microbiota que contribuirían a optimizar el procedimiento.

## Conflicto de intereses

Ninguno.

## Bibliografía

1. Vindigni SM, Surawicz CMC. Difficile infection: Changing epidemiology and management paradigms. *Clin Transl Gastroenterol*. 2015;6:e99.
2. Crobach MJT, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22 Suppl 4:S63–81.
3. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*. 1958;44:854–9.
4. Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, Libertucci J, Wolfe M, Onischi C, et al. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2015;149:102–9.
5. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 2:1–26.
6. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis treatment and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol*. 2013;108:478–98.
7. Bakken JS, Borody T, Brandt LJ, Brill JV, Demarco DC, Franzos MA, et al. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9:1044–9.
8. Olsen MA, Yan Y, Reske KA, Zilberberg M, Dubberke ER. Impact of *Clostridium difficile* recurrence on hospital readmissions. *Am J Infect Control*. 2015;43:318–22.
9. Olsen MA, Yan Y, Reske KA, Zilberberg MD, Dubberke ER. Recurrent *Clostridium difficile* infection is associated with increased mortality. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:164–70.
10. Orenstein R. Fidaxomicin failures in recurrent *Clostridium difficile* infection: A problem of timing. *Clin Infect Dis*. 2012;55:613–4.
11. Kassam Z, Lee CH, Yuan Y, Hunt RH. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: Systematic review and meta analysis. *Am J Gastroenterol*. 2013;108:500–8.
12. Costello SP, Conlon MA, Vuaran MS, Roberts-Thomson IC, Andrews JM. Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective: Clinical efficacy and bacterial viability data. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;42:1011–8.
13. Lee CH, Steiner T, Petrof EO, Smieja M, Roscoe D, Nematalah A, et al. Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2016;315:142–9.
14. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*. 2011;53:994–1002.
15. Sha S, Liang J, Chen M, Xu B, Liang C, Wei N, et al. Systematic review faecal microbiota transplantation therapy for digestive and nondigestive disorders in adults and children. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39:1003–32.
16. Chapman BC, Moore HB, Overbey DM, Morton AP, Harnke B, Gerich ME, et al. Fecal microbiota transplant in patients with *Clostridium difficile* infection: A systematic review. *J Trauma Acute Care Surg*. 2016;81:756–64.
17. Yoon SS, Brandt LJ. Treatment of refractory/recurrent *C. difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: A case series of 12 patients. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44:562–6.
18. Cammarota G, Masucci L, Ianiro G, Bibbò S, Dinoi G, Costamagna G, et al. Randomised clinical trial faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41:835–43.
19. Brandt LJ, Aroniadis OC. An overview of fecal microbiota transplantation: Techniques indications and outcomes. *Gastrointest Endosc*. 2013;78:240–9.
20. Agrawal M, Aroniadis OC, Brandt LJ, Kelly C, Freeman S, Surawicz C, et al. The long-term efficacy and safety of fecal microbiota transplant for recurrent severe and complicated *Clostridium difficile* infection in 146 elderly individuals. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50:403–7.
21. Friedman-Moraco RJ, Mehta AK, Lyon GM, Kraft CS. Fecal microbiota transplantation for refractory *Clostridium difficile* colitis in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2014;14:477–80.
22. Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, Khoruts A, Surawicz C, Afzali A, et al. Fecal microbiota transplant for treatment of *Clostridium difficile* infection in immunocompromised patients. *Am J Gastroenterol*. 2015;109:1065–71.
23. Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013;368:407–15.
24. Schwartz M, Gluck M, Koon S. Norovirus gastroenteritis after fecal microbiota transplantation for treatment of *Clostridium difficile* infection despite asymptomatic donors and lack of sick contacts. *Am J Gastroenterol*. 2013;108:1367.



25. García-García-de-Paredes A, Rodríguez-de-Santiago E, Aguilera-Castro L, Ferre-Aracil C, López-Sanromán A. Fecal microbiota transplantation. *Gastroenterol Hepatol*. 2015;38:123–34.
26. Konijeti GG, Sauk J, Shrimé MG, Gupta M, Ananthakrishnan AN. Cost effectiveness of competing strategies for management of recurrent *Clostridium difficile* infection: A decision analysis. *Clin Infect Dis*. 2014;58:1507–14.
27. Merlo G, Graves N, Brain D, Connelly L. Economic evaluation of fecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection in Australia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31:1927–32.
28. Home ClinicalTrials.gov [Internet] [citado 25 Nov 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/>
29. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*. 2017;66:569–80.



# Gut eradication of VIM-1 producing ST9 *Klebsiella oxytoca* after fecal microbiota transplantation for diarrhea caused by a *Clostridium difficile* hypervirulent R027 strain

Sergio García-Fernández <sup>a,b</sup>, María-Isabel Morosini <sup>a,b</sup>, Marta Cobo <sup>a,b</sup>, José Ramón Foruny <sup>c</sup>, Antonio López-Sanromán <sup>c</sup>, Javier Cobo <sup>b,d</sup>, José Romero <sup>a</sup>, Rafael Cantón <sup>a,b</sup>, Rosa del Campo <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

<sup>b</sup> Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Sevilla, Spain

<sup>c</sup> Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Servicio de Enfermedades infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 August 2016

Received in revised form 6 September 2016

Accepted 11 September 2016

Available online 16 September 2016

### Keywords:

Fecal microbiota transplantation

Carbapenemase eradication

Eco-evo strategy

Multidrug resistant bacteria

*Clostridium difficile* infection

## ABSTRACT

We report the fecal carriage eradication of a VIM-1-producing ST9 *Klebsiella oxytoca* strain in a pluripathological 84-year-old woman after fecal microbiota transplantation to control relapsing R027 hypervirulent *Clostridium difficile* infections. The donor was her son, in which the absence of fecal carbapenemase-producing bacteria was corroborated.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Fecal microbiota transplantation (FMT) has demonstrated to be a secure and effective procedure to control *Clostridium difficile* infection (CDI) (Kassam et al., 2013) with scarce secondary effects (Lee et al., 2014). FMT represents an ecological alternative to restore the normal gut microbiota in dysbiosis, being the eradication of intestinal multidrug-resistant bacteria a promising complementary target of this practice.

To date, the eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* (Stripling et al., 2015), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Wei et al., 2015), and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* (Lagier et al., 2015) after FMT has been communicated. In this study, we report the fecal carriage eradication of a VIM-1-producing *Klebsiella oxytoca* ST9 isolate in a pluripathological patient with relapsed CDI caused by a hypervirulent R027 strain.

We describe the case of an 84-year-old woman with several comorbidities that was admitted in our hospital in October 1st 2015, due to an acute pneumonia that was treated during 10 days with oral moxifloxacin (400 mg/24 h). In October 22nd, she was diagnosed of *C. difficile* diarrhea and also suffered an episode of acute renal failure. The laboratory diagnosis of CDI was made in stool samples by detection

of glutamate dehydrogenase (GDH) and toxin A/B with enzyme immunoassays [C. Diff Quik Chek (Techlab®)]. The molecular characterization of the isolate was made using a capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping (Indra et al., 2008) and a multiplex PCR (Persson et al., 2014). The isolate corresponded to the hypervirulent ribotype 027, produced A, B, and binary toxins and exhibited an 18 bp deletion of in the *tcdC* gene. The initial treatment included metronidazole for 4 days (500 mg orally every 8 hours for 2 days followed by 500 mg i.v. every 8 hours for another 2 days) followed by oral vancomycin for 15 days (500 mg/6 h). At the beginning of November 2015, she has a second CDI episode that was molecularly confirmed as a relapse. She was treated with fidaxomicin (200 mg/12 h) with a good clinical response, and she was discharged from the Hospital on November 27th.

As part of our routine and prospective epidemiological surveillance of multidrug resistant strains in fecal carriers, a rectal swab was obtained during the second patient's admittance. The swab was seeded in ChromID-ESBL and ChromID CARB agar plates (BioMérieux, France), and colonies were identified by MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Germany). Isolates were identified as *K. oxytoca* and the presence of a metallo-carbapenemase was confirmed by a positive modified Hodge test and the KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit (ROSCO Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark). The presence of a VIM-1 gene was demonstrated by PCR and sequencing (Poirel et al., 2011). Antimicrobial susceptibility testing was performed with the MicroScan system (Beckman, West

\* Corresponding author. Tel.: +34-91-3368542.

E-mail address: [rosacampo@yahoo.com](mailto:rosacampo@yahoo.com) (R. del Campo).

Sacramento, CA). The *K. oxytoca* isolate was resistant to amikacin, tobramycin, ciprofloxacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole remaining susceptible to aztreonam, gentamicin, colistin, and tigecycline (EUCAST criteria). The strain was further characterized using MLST and assigned to the sequence type ST9.

On December 18th, the patient was readmitted due to a third CDI episode that was initially controlled with vancomycin and the VIM-1-producing *K. oxytoca* fecal carriage was again confirmed. The FMT protocol was activated, being finally performed on December 22nd. Patient's son of 45 years old, with a healthy gastrointestinal status, was the FMT donor. A total of 100 g of feces were suspended in 500 ml of distilled water, centrifuged 5 min at 900 rpm, and filtered to eliminate the fiber and other solid residues. The supernatant was introduced by colonoscopy along the complete extension of the large bowel. The patient was discharged from the hospital on December 30th with food tolerance, no abdominal pain and, surprisingly, without carbapenemase-producing bacteria in the rectal swab control. Afterwards, the patient reported a marked constipation and a first fecal follow-up sample was collected on February 4th (6 weeks after FMT), and a second one was done after 6 months. In both samples, the absence of a carbapenemase-producing isolate was directly corroborated by the GeneXpert® Carba-R system (Cepheid, CA) also using ChromID CARB agar culture as a second confirmatory test. In addition, specific carbapenemase-PCRs were consistently negative using total DNA obtained from the feces. Six weeks after the FMT, *C. difficile* colonies were evidenced on the Brucella agar plates, corresponding to the same toxigenic 027 ribotype and *tcdC*-deleted isolate, but *C. difficile* was not present in the 6-month sample.

Intestinal carriage of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*, particularly carbapenemase-producing isolates, has been increasingly reported in both community and hospital setting in our country (Palacios-Baena et al., 2016). In the last two years, a prospective surveillance study to identify patients with fecal carriage of carbapenemase-producing isolates was implemented in our hospital. Patients colonized by these organisms are isolated in separate rooms, and epidemiological measures are taken to limit the widespread of these bacteria. Antimicrobial agents for gut decontamination were frequently used in the past, but it has been now limited to avoid the selection of multidrug-resistant organisms (Buelow et al., 2014; Kronman et al., 2014). Some ecological strategies have also been proposed to eradicate the gut colonization with these multidrug resistant organisms, including the administration of probiotics and FMT, whose efficacy has been recently demonstrated in a mice model (Caballero et al., 2015). Documented cases of FMT success in eliminating ESBL- or carbapenemase-producing organisms from the gut remain scarce (Crum-Cianflone et al., 2015; Singh et al., 2014). Our study corroborates this possibility and strengthens the putative utility of extending this intervention to eradicate gut carriage of multidrug-resistance, as previously proposed (Stripling et al., 2015; Wei et al., 2015). It is remarkable that FMT represents an eco-evo ('ecological-evolutionary' biology) technique that could strongly minimize the colonization by antibiotic-resistant organisms and could also preclude the interactions among bacterial communities sharing and mobilizing resistance genes and genetic platforms (Baquero et al., 2011). Our report has the limitation that it comprises only a single case. It is evident that more work and controlled studies need to be performed to prove the role of FMT in the eradication of multidrug-resistant microorganisms.

## Funding

This work was supported by the PI13/00205 project (ISCIII-FIS), from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Spain), and co-financed by the European Development Regional Fund "A Way to Achieve Europe," ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0004).

## Competing Interests

None to declare.

## Ethical Approval

An informed consent for Fecal Microbiota Transplantation was signed by the patient, which also agreed in the publication of these data.

## References

- Baquero F, Coque TM, de la Cruz F. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3649–60.
- Buelow E, Gonzalez TB, Versluis D, Oostdijk EA, Ogilvie LA, van Mourik MS, et al. Effects of selective digestive decontamination (SDD) on the gut resistome. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:2215–23.
- Caballero S, Carter R, Ke X, Sušac B, Leiner IM, Kim GJ, et al. Distinct but spatially overlapping intestinal niches for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Pathog* 2015;11, e1005132.
- Crum-Cianflone NF, Sullivan E, Ballon-Landa G. Fecal microbiota transplantation and successful resolution of multidrug-resistant-organism colonization. *J Clin Microbiol* 2015;53:1986–9.
- Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol* 2008;57(Pt 11):1377–82.
- Kassam Z, Lee CH, Yuan Y, Hunt RH. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:500–8.
- Kronman MP, Zerr DM, Qin X, Englund J, Cornell C, Sanders JE, et al. Intestinal decontamination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* after recurrent infections in an immunocompromised host. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;80:87–9.
- Lagier JC, Million M, Fournier PE, Brouqui P, Raoult D. Faecal microbiota transplantation for stool decolonization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 2015;90:173–4.
- Lee CH, Belanger JE, Kassam Z, Smieja M, Higgins D, Broukhanski G, et al. The outcome and long-term follow-up of 94 patients with recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection using single to multiple fecal microbiota transplantation via retention enema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:1425–8.
- Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernández-Martínez M, et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain. *J Infect* 2016;72:152–60.
- Persson S, Jensen JN, Olsen KE. Multiplex PCR method for detection of *Clostridium difficile* *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, and *cdtB* and internal in-frame deletion of *tcdC*. *J Clin Microbiol* 2014;49:4299–300.
- Poirier L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119–23.
- Singh R, Nood E, Nieuwdorp M, van Dam B, ten Berge IJ, Geerlings SE, et al. Donor feces infusion for eradication of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* in a patient with end stage renal disease. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O977–8.
- Stripling J, Kumar R, Baddley JW, Nellore A, Dixon P, Howard D, et al. Loss of vancomycin-resistant *Enterococcus* fecal dominance in an organ transplant patient with *Clostridium difficile* colitis after fecal microbiota transplant. *Open Forum Infect Dis* 2015;2:ofv078.
- Wei Y, Gong J, Zhu W, Guo D, Gu L, Li N, et al. Fecal microbiota transplantation restores dysbiosis in patients with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* enterocolitis. *BMC Infect Dis* 2015;15:15–265.

**Conformidad de la Dirección del HURyC**

La Dirección del Hospital Universitario Ramón y Cajal, visto el informe favorable emitido por el Comité de Ética de la Investigación que ha evaluado el estudio:

**CLOSTRIDIUM DIFFICILE: SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA, EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y TRANSFERENCIA DE MATERIA FECAL**

**Versión Protocolo 14 de febrero de 2018**

**CEI/CEIm evaluador: CEIm HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL**

**Investigador Principal en el Hospital Universitario Ramón y Cajal: Dra. Rosa del Campo Moreno (Microbiología)**

Acepta la realización de dicho estudio en el centro, con estricta sujeción al protocolo aprobado y, cuando su ejecución implique algún ingreso o gasto específico, al contrato que se tendrá que formalizar al efecto a través de la entidad gestora: *Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal*.

Madrid a 7 de junio de 2018

El director gerente

  
 Hospital Universitario  
Ramón y Cajal  
SaludMadrid  
 Comunidad de Madrid

p.d.f. de 7/05/2018

Fdo. Dra M<sup>a</sup> Angeles Gálvez Múgica



**DICTAMEN DEL COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS**

**DÑA. Itziar de Pablo López de Abechuco**, Secretaria del COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL

**CERTIFICA**

Que se ha evaluado la propuesta del promotor referida al Estudio:

**CLOSTRIDIUM DIFFICILE: SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA, EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y TRANSFERENCIA DE MATERIA FECAL**

**Versión Protocolo 14 de febrero de 2018**

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIm actuando como comité evaluador, emite dictamen **FAVORABLE** y acepta que dicho estudio sea realizado en los centros siguientes por los investigadores principales que se relacionan a continuación:

**Dra. Rosa del Campo Moreno / Hospital Universitario Ramón y Cajal**

**Y HACE CONSTAR QUE:**

- 1º En la reunión celebrada el día **26 de febrero de 2018 ACTA 339** se decidió emitir el informe correspondiente al estudio de referencia.
- 2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente y las normas de funcionamiento interno del comité para que la decisión del citado CEIm sea válida.
- 3º El CEIm, tanto en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ ICH/ 135/95)
- 4º La composición actual del CEIm es la siguiente:

<b>PRESIDENTE</b>	Sonsoles Sancho García.	Oncología Radioterápica
<b>VICEPRESIDENTE</b>	Mª Ángeles Gálvez	Farmacología Clínica
<b>SECRETARIO TECNICO</b>	Itziar de Pablo López de Abechuco	Farmacología Clínica
<b>VOCALES</b>	Mª Jesús Blanchard Rodríguez	Hematología
	Irene Cabrera Troye	Miembro Lego, ajeno a la investigación biomédica/asistencia clínica
	Yolanda de Blas Fernández	DUE Servicio de Urgencias
	Guillermo García Ribas	Neurología
	Carmen Guillén Ponce	Oncología Médica.
	Rosa Ana Hernández Antolín	Cardiología
	Manuel Luque Ramírez	Endocrinología y Nutrición.
	María Muñoz García	Farmacia Hospitalaria.





	Alfonso Muriel García	Bioestadística Clínica
	Cristina Pueyo López	Farmacia Hospitalaria. Máster en Bioética
	Carmen Ruiz Ballesteros	Miembro Lego, ajeno a la investigación biomédica/asistencia clínica. Licenciada en Derecho
	Javier Sánchez Casajús	Miembro Lego, ajeno a la investigación biomédica/asistencia clínica
	José Luis San Millán López	Genética Molecular
	Sonia Soto Díaz	Medicina Familiar y Comunitaria.
	Marta del Álamo Camuñas	Biología-IRYCIS
	Carmen Herrero Domínguez-Berrueta	Farmacéutica de Primaria
	Ana Jiménez Gordo	Oncología Médica. Hospital Universitario Infanta Sofía.
	Javier Martínez González	Gastroenterología.
	Sergio Serrano Villar	Enfermedades Infecciosas. Miembro de la Comisión de Investigación.

En el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación, ni en el dictamen de la solicitud de autorización del mismo.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor

Madrid a 07 de junio de 2018

Fdo.: Dña. Itziar de Pablo López de Abechuco  
Secretaria CEIm





